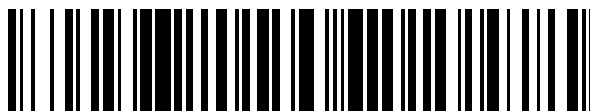


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 629**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/08** (2006.01)

**A61P 9/12** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

**C07K 7/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2009 E 09836520 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2376101**

54 Título: **Efectores de beta-arrestina y composiciones y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

**29.12.2008 US 141126 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.02.2016**

73 Titular/es:

**TREVENA, INC. (100.0%)  
1018 West 8th Avenue Suite A  
King Of Prussia, PA 19406, US**

72 Inventor/es:

**YAMASHITA, DENNIS y  
CHEN, XIAO-TAO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 558 629 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Efectores de beta-arrestina y composiciones y métodos de uso de los mismos

**Solicitudes relacionadas**

5 La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° 61/141.126, presentada el 29 de diciembre de 2008.

**Campo de la invención**

La presente solicitud se refiere a una familia de compuestos que actúan de efectores de  $\beta$ -arrestina. Tales compuestos pueden proporcionar beneficio terapéutico significativo en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como insuficiencia cardíaca aguda o crisis hipertensiva aguda.

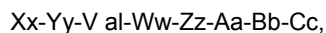
**10 Antecedentes**

15 Se han desarrollado fármacos que se dirigen a GPCR basándose en un paradigma de señalización en el que la estimulación del receptor por un agonista (por ejemplo, angiotensina II) conduce a la activación de una "proteína G" heterotrímica, que entonces conduce al segundo mensajero/señalización aguas abajo (por ejemplo, mediante diacilglicerol, inositol-trifosfato, calcio, etc.) y cambios en la función fisiológica (por ejemplo, tensión arterial y homeostasis de los líquidos). Existe la necesidad de fármacos adicionales que se dirigen a GPCR para el tratamiento de patología asociada a tensión arterial y homeostasis de los líquidos.

20 La anterior descripción de técnica relacionada no pretende de ningún modo ser una admisión de que cualquiera de los documentos descritos en su interior, que incluyen las solicitudes de patente de Estados Unidos en trámite, sea estado de la técnica para la presente invención. Además, la descripción en el presente documento de cualquier desventaja asociada a los productos, métodos y/o aparatos descritos no pretende limitar la invención. De hecho, los aspectos de la invención pueden incluir ciertas características de los productos, métodos y/o aparatos descritos, sin sufrir sus desventajas descritas.

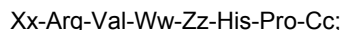
**Sumario de la invención**

25 Según algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona novedosos efectores de  $\beta$ -arrestina que tienen la estructura:



En la estructura anterior, las variables Aa, Bb, Cc, Ww, Xx, Yy y Zz pueden seleccionarse de los grupos respectivos de restos químicos o biológicos descritos después en la descripción detallada. También se proporcionan derivados de efectores de  $\beta$ -arrestina y miméticos. También se proporcionan procesos para preparar los compuestos.

30 Según algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona novedosos efectores de  $\beta$ -arrestina que tienen la estructura:



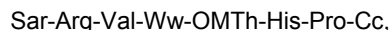
35 o sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de los mismos. En la estructura anterior, las variables Cc, Ww, Xx y Zz pueden seleccionarse de los grupos respectivos de restos químicos o biológicos descritos después en la descripción detallada. También se proporcionan derivados de efectores de  $\beta$ -arrestina y miméticos. También se proporcionan procesos para preparar los compuestos.

Según algunas realizaciones, los compuestos de la presente divulgación comprenden la siguiente fórmula:



40 o sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de los mismos. En la estructura anterior, las variables Cc, Ww y Zz pueden seleccionarse de los grupos respectivos de restos químicos o biológicos descritos después en la descripción detallada. También se proporcionan derivados de efectores de  $\beta$ -arrestina y miméticos. También se proporcionan procesos para preparar los compuestos.

Según algunas realizaciones, los compuestos comprenden la siguiente fórmula:



45 o sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de los mismos. En la estructura anterior, las variables Cc y Ww pueden seleccionarse de los grupos respectivos de restos químicos o biológicos descritos después en la descripción detallada. También se proporcionan derivados de efectores de  $\beta$ -arrestina y miméticos. También se proporcionan procesos para preparar los compuestos.

Según algunas realizaciones, la composición comprende un péptido o peptidomimético seleccionado del grupo que consiste en

a) un péptido o peptidomimético que comprende la secuencia de

Xx-Yy-Val-Ww-Zz-Aa-Bb-Cc,

5 en la que Xx está seleccionado del grupo que consiste en nulo, sarcosina, N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina, N,N-dimetilglicina, ácido L-aspartico, ácido D-aspartico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico, ácido N-metil-L-aspartico, ácido N-metil-L-glutámico, ácido pirrolid-1-ilacético y ácido morfolin-4-ilacético;

Yy está seleccionado del grupo que consiste en L-arginina y L-lisina;

10 Ww está seleccionado del grupo que consiste en L-isoleucina, glicina, L-tirosina, O-metil-L-tirosina, L-valina, L-fenilalanina, 3-hidroxi-L-tirosina, 2,6-dimetil-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 4-fluorofenil-L-alanina, 2,6-difluoro-L-tirosina, 3-nitro-L-tirosina, 3,5-dinitro-L-tirosina, 3,5-dibromo-L-tirosina, 3-cloro-L-tirosina, O-alil-L-tirosina y 3,5-diiodo-L-tirosina;

Zz está seleccionado del grupo que consiste en L-isoleucina, L-valina, L-tirosina, ácido L-glutámico, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-arginina, O-metil-L-treonina, D-alanina y L-norvalina;

15 Aa está seleccionado del grupo que consiste en L-histidina, L-histidina-amida y L-lisina;

Bb está seleccionado del grupo que consiste en L-prolina, L-prolina-amida, D-prolina y D-prolina-amida; y

Cc está seleccionado del grupo que consiste en nulo, L-isoleucina, L-isoleucina-amida, glicina, glicina-amida, L-alanina, L-alanina-amida, D-alanina, D-fenilalanina, L-norvalina;

20 a condición de que cuando Xx sea ácido L-aspartico, Cc no sea L-fenilalanina; cuando Xx sea sarcosina, Cc no sea L-isoleucina; cuando Ww sea glicina, Cc no sea glicina; cuando Xx sea sarcosina y Zz sea L-valina, Cc no sea L-alanina; y cuando Xx sea sarcosina, Ww sea una L-tirosina, y Zz sea L-isoleucina, Cc no sea L-alanina;

25 b) un péptido o peptidomimético en el que los miembros de la secuencia del péptido o peptidomimético mantienen sus posiciones relativas como aparecen en la secuencia descrita en (a), en el que espaciadores de entre 1 y 3 aminoácidos o análogos de aminoácidos se insertan entre uno o más de los aminoácidos o análogos de aminoácidos como se describe en (a) y en el que la longitud total del péptido o peptidomimético es entre 6 y 25 aminoácidos y/o análogos de aminoácidos; y

c) un péptido o peptidomimético que es al menos el 70 % idéntico al péptido o peptidomiméticos descritos en (a).

Según otras realizaciones, las composiciones comprenden un péptido o peptidomimético seleccionado del grupo que consiste en

30 a) un péptido o peptidomimético que comprende la secuencia de

Xx-Arg-Val-Ww-Zz-His-Pro-Cc,

en la que Xx está seleccionado del grupo que consiste en sarcosina, N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina, N,N-dimetilglicina, ácido L-aspartico, ácido D-aspartico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico, ácido N-metil-L-aspartico, ácido N-metil-L-glutámico, ácido pirrolid-1-ilacético y ácido morfolin-4-ilacético;

35 Ww está seleccionado del grupo que consiste en L-isoleucina, glicina, L-tirosina, O-metil-L-tirosina, L-valina, L-fenilalanina, 3-hidroxi-L-tirosina, 2,6-dimetil-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 4-fluorofenil-L-alanina, 2,6-difluoro-L-tirosina, 3-nitro-L-tirosina, 3,5-dinitro-L-tirosina, 3,5-dibromo-L-tirosina, 3-cloro-L-tirosina, O-alil-L-tirosina y 3,5-diiodo-L-tirosina;

40 Zz está seleccionado del grupo que consiste en L-isoleucina, L-valina, L-tirosina, ácido L-glutámico, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-arginina, O-metil-L-treonina, D-alanina y L-norvalina; y

Cc está seleccionado del grupo que consiste en L-isoleucina, L-isoleucina-amida, glicina, glicina-amida, L-alanina, L-alanina-amida, D-alanina, D-fenilalanina y L-norvalina;

45 a condición de que cuando Xx sea ácido L-aspartico, Cc no sea L-fenilalanina; cuando Xx sea sarcosina, Cc no sea L-isoleucina; cuando Ww sea glicina, Cc no sea glicina; cuando Xx sea sarcosina y Zz sea L-valina, Cc no sea L-alanina; y cuando Xx sea sarcosina, Ww sea una L-tirosina y Zz sea L-isoleucina, Cc no sea L-alanina;

b) un péptido o peptidomimético en el que los miembros de la secuencia del péptido o peptidomimético mantienen sus posiciones relativas como aparecen en la secuencia descrita en (a), en el que espaciadores de entre 1 y 3 aminoácidos o análogos de aminoácidos se insertan entre uno o más de los aminoácidos o análogos de aminoácidos como se describe en (a) y en el que la longitud total del péptido o peptidomimético es entre 8 y 25

aminoácidos y/o análogos de aminoácidos; y

c) un péptido o peptidomimético que es al menos el 70 % idéntico al péptido o peptidomiméticos descritos en (a).

Según otras realizaciones, las composiciones comprenden un péptido o peptidomimético seleccionado del grupo que consiste en

5 a) un péptido o peptidomimético que comprende la secuencia de Sar-Arg-Val-Ww-Zz-His-Pro-Cc,

en la que Ww está seleccionado del grupo que consiste en L-tirosina, 3-hidroxi-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 2,6-difluoro-L-tirosina, 3-nitro-L-tirosina, 3,5-dinitro-L-tirosina y 3-cloro-L-tirosina;

Zz está seleccionado del grupo que consiste en L- isoleucina, L-lisina y O-metil-L-treonina; y

Cc está seleccionado del grupo que consiste en D-alanina y L-alanina

10 a condición de que cuando Xx sea sarcosina, Ww sea una L-tirosina y Zz sea L-isoleucina, Cc no sea L-alanina;

b) un péptido o peptidomimético en el que los miembros de la secuencia del péptido o peptidomimético mantienen sus posiciones relativas como aparecen en la secuencia descrita en (a), en el que espaciadores de entre 1 y 3 aminoácidos o análogos de aminoácidos se insertan entre uno o más de los aminoácidos o análogos de aminoácidos como se describe en (a) y en el que la longitud total del péptido o peptidomimético es entre 8 y 25 aminoácidos y/o análogos de aminoácidos; y

15 aminoácidos y/o análogos de aminoácidos; y

c) un péptido o peptidomimético que es al menos el 70 % idéntico al péptido o peptidomiméticos descritos en (a).

En más realizaciones específicas, Ww está seleccionado del grupo que consiste en L-tirosina y 3-hidroxi-L-tirosina; y Zz está seleccionado del grupo que consiste en L-isoleucina y L-lisina. Opcionalmente, el péptido o peptidomimético comprende la secuencia de SEC ID N°: 23, 27 o 67.

20 Según otras realizaciones, las composiciones comprenden un péptido o peptidomimético seleccionado del grupo que consiste en

a) un péptido o peptidomimético que comprende la secuencia de

Sar-Arg-Val-Ww-OMTh-His-Pro-Cc,

en la que Ww está seleccionado del grupo que consiste en L-tirosina, 3-hidroxi-L-tirosina; 3-fluoro-L-tirosina y 3-cloro-L-tirosina; y

25 aminoácidos y/o análogos de aminoácidos; y

Cc está seleccionado del grupo que consiste en D-alanina y L-alanina;

b) un péptido o peptidomimético en el que los miembros de la secuencia del péptido o peptidomimético mantienen sus posiciones relativas como aparecen en la secuencia descrita en (a), en el que espaciadores de entre 1 y 3 aminoácidos o análogos de aminoácidos se insertan entre uno o más de los aminoácidos o análogos de aminoácidos como se describe en (a) y en el que la longitud total del péptido o peptidomimético es entre 8 y 25 aminoácidos y/o análogos de aminoácidos; y

30 aminoácidos y/o análogos de aminoácidos; y

c) un péptido o peptidomimético que es al menos el 70 % idéntico al péptido o peptidomiméticos descritos en (a).

En más realizaciones específicas, Ww está seleccionado del grupo que consiste en 3-hidroxi-L-tirosina; 3-fluoro-L-tirosina y 3-cloro-L-tirosina; y Cc es L-alanina. Opcionalmente, el péptido o peptidomimético comprende la secuencia de SEC ID N°: 77, 78 o 79.

35 aminoácidos y/o análogos de aminoácidos; y

Según otras realizaciones, las composiciones comprenden un péptido o peptidomimético seleccionado del grupo que consiste en

a) un péptido o peptidomimético que comprende la secuencia de

Sar-Arg-Val-Ww-Tyr-His-Pro-NH<sub>2</sub>,

en la que Ww está seleccionado del grupo que consiste en L-tirosina, 3-hidroxi-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 2,6-difluoro-L-tirosina, 3-nitro-L-tirosina, 3,5-dinitro-L-tirosina y 3-cloro-L-tirosina;

40 aminoácidos y/o análogos de aminoácidos; y

b) un péptido o peptidomimético en el que los miembros de la secuencia del péptido o peptidomimético mantienen sus posiciones relativas como aparecen en la secuencia descrita en (a), en el que espaciadores de entre 1 y 3 aminoácidos o análogos de aminoácidos se insertan entre uno o más de los aminoácidos o análogos de aminoácidos como se describe en (a) y en el que la longitud total del péptido o peptidomimético es entre 7 y 25 aminoácidos y/o análogos de aminoácidos; y

45 aminoácidos y/o análogos de aminoácidos; y

c) un péptido o peptidomimético que es al menos el 70 % idéntico al péptido o peptidomiméticos descritos en (a).

Opcionalmente, el péptido o peptidomimético comprende la secuencia de SEC ID N°: 26.

Según otras realizaciones, las composiciones comprenden un péptido o peptidomimético seleccionado del grupo que consiste en

5 a) un péptido o peptidomimético que comprende la secuencia de

NMA<sub>l</sub>A-Arg-Val-Ww-Zz-His-Pro-Cc,

en la que Ww está seleccionado del grupo que consiste en L-tirosina, 3-hidroxi-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 2,6-difluoro-L-tirosina, 3-nitro-L-tirosina, 3,5-dinitro-L-tirosina y 3-cloro-L-tirosina;

Zz está seleccionado del grupo que consiste en L- isoleucina, L-lisina y O-metil-L-treonina;

10 y Cc está seleccionado del grupo que consiste en D-alanina y L-alanina;

b) un péptido o peptidomimético en el que los miembros de la secuencia del péptido o peptidomimético mantienen sus posiciones relativas como aparecen en la secuencia descrita en (a), en el que espaciadores de entre 1 y 3 aminoácidos o análogos de aminoácidos se insertan entre uno o más de los aminoácidos o análogos de aminoácidos como se describe en (a) y en el que la longitud total del péptido o peptidomimético es entre 8 y 25 aminoácidos y/o análogos de aminoácidos; y

15 c) un péptido o peptidomimético que es al menos el 70 % idéntico al péptido o peptidomiméticos descritos en (a).

En más realizaciones específicas, Ww es L-tirosina, Zz es L-isoleucina y/o Cc es L-alanina. Opcionalmente, el péptido o peptidomimético comprende la secuencia de SEC ID N°: 34.

Opcionalmente, cualquiera de las composiciones descritas anteriormente es cíclica, dimerizada y/o trimerizada.

20 Según otras realizaciones, las composiciones comprenden un ligando sesgado de  $\beta$ -arrestina del receptor de tipo 1 de la angiotensina 2 (AT1R). En realizaciones específicas, el ligando tiene una concentración eficaz al 50 % inferior para reclutar  $\beta$ -arrestina-2 para un receptor de tipo 1 de la angiotensina 2 que para la acumulación de IP1. En más realizaciones específicas, la concentración eficaz al 50 % para reclutar  $\beta$ -arrestina-2 para un receptor de tipo 1 de la angiotensina 2 del ligando es diez veces menor que aquella para la acumulación de IP1 del ligando. En más realizaciones específicas, el ligando es una composición que comprende un péptido o peptidomimético seleccionado del grupo que consiste en

25 a) un péptido o peptidomimético que comprende la secuencia de

Xx-Yy-Val-Ww-Zz-Aa-Bb-Cc,

en la que Xx está seleccionado del grupo que consiste en nulo, sarcosina, N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina, N,N-dimetilglicina, ácido L-aspartico, ácido D-aspartico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico, ácido N-metil-L-aspartico, ácido N-metil-L-glutámico, ácido pirrolid-1-ilacético y ácido morfolin-4-ilacético;

30 Yy está seleccionado del grupo que consiste en L-arginina y L-lisina;

Ww está seleccionado del grupo que consiste en L-isoleucina, glicina, L-tirosina, O-metil-L-tirosina, L-valina, L-fenilalanina, 3-hidroxi-L-tirosina, 2,6-dimetil-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 4-fluorofenil-L-alanina, 2,6-difluoro-L-tirosina, 3-nitro-L-tirosina, 3,5-dinitro-L-tirosina, 3,5-dibromo-L-tirosina, 3-cloro-L-tirosina, O-alil-L-tirosina y 3,5-diyodo-L-tirosina;

35 Zz está seleccionado del grupo que consiste en L-isoleucina, L-valina, L-tirosina, ácido L-glutámico, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-arginina, O-metil-L-treonina, D-alanina y L-norvalina;

Aa está seleccionado del grupo que consiste en L-histidina, L-histidina-amida y L-lisina;

40 Bb está seleccionado del grupo que consiste en L-prolina, L-prolina-amida, D-prolina y D-prolina-amida; y

Cc está seleccionado del grupo que consiste en nulo, L-isoleucina, L-isoleucina-amida, glicina, glicina-amida, L-alanina, L-alanina-amida, D-alanina, D-fenilalanina, L-norvalina;

45 a condición de que cuando Xx sea ácido L-aspartico, Cc no sea L-fenilalanina; cuando Xx sea sarcosina, Cc no sea L-isoleucina; cuando Ww sea glicina, Cc no sea glicina; cuando Xx sea sarcosina y Zz sea L-valina, Cc no sea L-alanina; y cuando Xx sea sarcosina, Ww sea una L-tirosina y Zz sea L-isoleucina, Cc no sea L-alanina;

b) un péptido o peptidomimético en el que los miembros de la secuencia del péptido o peptidomimético mantienen sus posiciones relativas como aparecen en la secuencia descrita en (a), en el que espaciadores de entre 1 y 3

aminoácidos o análogos de aminoácidos se insertan entre uno o más de los aminoácidos o análogos de aminoácidos como se describe en (a) y en el que la longitud total del péptido o peptidomimético es entre 6 y 25 aminoácidos y/o análogos de aminoácidos; y

c) un péptido o peptidomimético que es al menos el 70 % idéntico al péptido o peptidomiméticos descritos en (a).

- 5 En más realizaciones específicas, el ligando es una composición que comprende un péptido o peptidomimético seleccionado del grupo que consiste en

a) un péptido o peptidomimético que comprende la secuencia de Xx-Arg-Val-Ww-Zz-His-Pro-Cc,

10 en la que Xx está seleccionado del grupo que consiste en sarcosina, N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina, N,N-dimetilglicina, ácido L-aspartico, ácido D-aspartico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico, ácido N-metil-L-aspartico, ácido N-metil-L-glutámico, ácido pirrolid-1-ilacético y ácido morfolin-4-ilacético;

Ww está seleccionado del grupo que consiste en L-isoleucina, glicina, L-tirosina, O-metil-L-tirosina, L-valina, L-fenilalanina, 3-hidroxi-L-tirosina, 2,6-dimetil-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 4-fluorofenil-L-alanina, 2,6-difluoro-L-tirosina, 3-nitro-L-tirosina, 3,5-dinitro-L-tirosina, 3,5-dibromo-L-tirosina, 3-cloro-L-tirosina, O-alil-L-tirosina y 3,5-diyodo-L-tirosina;

15 Zz está seleccionado del grupo que consiste en L-isoleucina, L-valina, L-tirosina, ácido L-glutámico, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-arginina, O-metil-L-treonina, D-alanina y L-norvalina; y

Cc está seleccionado del grupo que consiste en L-isoleucina, L-isoleucina-amida, glicina, glicina-amida, L-alanina, L-alanina-amida, D-alanina, D-fenilalanina y L-norvalina;

20 a condición de que cuando Xx sea ácido L-aspartico, Cc no sea L-fenilalanina; cuando Xx sea sarcosina, Cc no sea L-isoleucina; cuando Ww sea glicina, Cc no sea glicina; cuando Xx sea sarcosina y Zz sea L-valina, Cc no sea L-alanina; y cuando Xx sea sarcosina, Ww sea una L-tirosina y Zz sea L-isoleucina, Cc no sea L-alanina;

25 b) un péptido o peptidomimético en el que los miembros de la secuencia del péptido o peptidomimético mantienen sus posiciones relativas como aparecen en la secuencia descrita en (a), en el que espaciadores de entre 1 y 3 aminoácidos o análogos de aminoácidos se insertan entre uno o más de los aminoácidos o análogos de aminoácidos como se describe en (a) y en el que la longitud total del péptido o peptidomimético es entre 8 y 25 aminoácidos y/o análogos de aminoácidos; y

c) un péptido o peptidomimético que es al menos el 70 % idéntico al péptido o peptidomiméticos descritos en (a).

30 Según otras realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En realizaciones específicas, el vehículo farmacéuticamente aceptable es agua estéril pura, solución salina tamponada con fosfato o una disolución acuosa de glucosa.

35 Según otras realizaciones, la invención proporciona el uso de un péptido o composición de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno cardiovascular. En otras realizaciones, la invención proporciona un péptido o composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno cardiovascular. En realizaciones específicas, el trastorno cardiovascular está seleccionado de los grupos que consisten en insuficiencia cardíaca aguda descompensada, hipertensión crónica, crisis hipertensiva, insuficiencia cardíaca aguda congestiva, angina, infarto agudo de miocardio, insuficiencia ventricular izquierda, insuficiencia cerebrovascular, hemorragia intracraneal, hipertensión esencial, hipertensión posoperatoria, enfermedad cardíaca hipertensiva, enfermedad renal hipertensiva, hipertensión renovascular, hipertensión maligna, estabilización del paciente tras trasplante renal, cardiomiopatía dilatada, miocarditis, estabilización del paciente tras trasplante cardíaco, trastornos asociados a tratamiento posterior a prótesis endovascular, hipertensión neurogénica, preeclampsia, aneurisma de la aorta abdominal. En más realizaciones específicas, el trastorno cardiovascular es insuficiencia cardíaca. En otras realizaciones específicas, la insuficiencia cardíaca es insuficiencia cardíaca aguda.

45 Según otras realizaciones, la presente divulgación también proporciona un método de tratamiento de enfermedad infecciosa viral asociada a AT1R que comprende: administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más composiciones descritas anteriormente. En realizaciones específicas, la una o más composiciones se administran mediante inyección intravenosa.

Según otras realizaciones, la presente divulgación también proporciona un método de tratamiento de trastornos cardiovasculares que comprenden: administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más péptidos peptidomiméticos que comprenden la secuencia de

50 Sar-Arg-Val-Ww-Zz-His-Pro-Cc,

en la que Ww está seleccionado del grupo que consiste en L-isoleucina, glicina y L-tirosina;

Zz está seleccionado del grupo que consiste en L-valina, L-isoleucina y L-glutamato; y

Cc está seleccionado del grupo que consiste en L-isoleucina, glicina y L-alanina.

En realizaciones específicas, el uno o más péptidos peptidomiméticos están seleccionados del grupo que consiste en SEC ID N°: 3, 5, 7, 9, 11, 14 y 16. En más realizaciones específicas, el trastorno cardiovascular está seleccionado de los grupos que consisten en hipertensión crónica, crisis hipertensiva, insuficiencia cardíaca aguda congestiva, angina, infarto agudo de miocardio, insuficiencia ventricular izquierda, insuficiencia cerebrovascular, hemorragia intracraneal, insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca aguda descompensada, hipertensión esencial, hipertensión posoperatoria, enfermedad cardíaca hipertensiva, enfermedad renal hipertensiva, hipertensión renovascular, hipertensión maligna, estabilización del paciente tras trasplante renal, cardiomiopatía dilatada, miocarditis, estabilización del paciente tras trasplante cardíaco, trastornos asociados a tratamiento posterior a prótesis endovascular, hipertensión neurogénica, preeclampsia, aneurisma de la aorta abdominal, y cualquier trastorno cardiovascular con un componente hemodinámico. En otras realizaciones específicas, el trastorno cardiovascular es un trastorno cardiovascular agudo. En otras realizaciones específicas, el trastorno cardiovascular agudo es crisis hipertensiva aguda, toxemia del embarazo, infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardíaca aguda congestiva, enfermedad cardíaca isquémica aguda, hipertensión pulmonar, hipertensión posoperatoria, migraña, retinopatía y cirugía cardíaca/de válvulas postoperatoria.

Según otras realizaciones, la presente divulgación también proporciona un método de tratamiento de enfermedad infecciosa viral asociada a AT1R que comprende: administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más un péptidos peptidomiméticos que comprenden la secuencia de

Sar-Arg-Val-Ww-Zz-His-Pro-Cc,

en la que Ww está seleccionado del grupo que consiste en L-isoleucina, glicina y L-tirosina;

Zz está seleccionado del grupo que consiste en L-valina, L-isoleucina y L-glutamato; y

Cc está seleccionado del grupo que consiste en L-isoleucina, glicina y L-alanina.

En realizaciones específicas, el uno o más péptidos peptidomiméticos están seleccionados del grupo que consiste en SEC ID N°: 3, 5, 7, 9, 11, 14 y 16. Según otras realizaciones, la invención también proporciona un método de agonizar  $\beta$ -arrestina que comprende: administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de una o más composiciones descritas anteriormente.

Según algunas realizaciones, la presente invención se extiende a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Naturalmente, los compuestos de la presente invención pueden emplearse en cualquier forma, tal como un sólido o disolución (por ejemplo, disolución acuosa) como se describe adicionalmente más adelante. El compuesto, por ejemplo, puede obtenerse y emplearse en una forma liofilizada sola o con aditivos adecuados.

La presente invención se extiende a un péptido o composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno cardiovascular. También se proporciona el uso de un péptido o composición farmacéutica de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno cardiovascular.

#### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Antes de describir las presentes proteínas, secuencias de nucleótidos, péptidos, etc., y métodos, se entiende que la presente invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, vectores y reactivos particulares descritos, ya que éstos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares solo, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que se limitará solo por las reivindicaciones adjuntas.

La presente solicitud describe una familia de compuestos, efectores de  $\beta$ -arrestina, con un perfil único. Los compuestos de la presente invención actúan de agonistas de la transducción de señales mediada por  $\beta$ -arrestina/GRK mediante el receptor de angiotensina AT1. Así, estos compuestos estimulan las vías de señalización que proporcionan beneficio terapéutico significativo en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares tales como insuficiencia cardíaca aguda o crisis hipertensiva aguda.

Según algunas realizaciones, los compuestos comprenden la siguiente fórmula:

Xx-Yy-Val-Ww-Zz-Aa-Bb-Cc,

en la que Xx es nulo, sarcosina, N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina, N,N-dimetilglicina, ácido L-aspartico, ácido D-aspartico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico, ácido N-metil-L-aspartico, ácido N-metil-L-glutámico, ácido pirrolid-1-ilacético o ácido morfolin-4-ilacético; Yy es L-arginina o L-lisina; Ww es L-isoleucina, glicina, L-tirosina, O-metil-L-tirosina, L-valina, L-fenilalanina, 3-hidroxi-L-tirosina, 2,6-dimetil-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 4-fluorofenil-L-alanina, 2,6-difluoro-L-tirosina, 3-nitro-L-tirosina, 3,5-dinitro-L-tirosina, 3,5-dibromo-L-tirosina, 3-cloro-L-tirosina, O-alil-L-tirosina o 3,5-diyodo-L-tirosina; Zz es L-isoleucina, L-valina, L-tirosina, ácido L-glutámico, L-fenilalanina, L-histidina,

L-lisina, L-arginina, O-metil-L-treonina, D-alanina o L-norvalina; Aa es L-histidina, L-histidina-amida o L-lisina; Bb es L-prolina, L-prolina-amida, D-prolina, D-prolina-amida y Cc es nulo, L-isoleucina, L-isoleucina-amida, glicina, glicina-amida, L-alanina, L-alanina-amida, D-alanina, D-fenilalanina, L-norvalina;

5 a condición de que cuando Xx sea ácido L-aspártico, Cc no sea L-fenilalanina; a condición de que cuando Xx sea sarcosina, Cc no sea L-isoleucina;

a condición de que cuando Ww sea glicina, Cc no sea glicina;

a condición de que cuando Xx sea sarcosina y Zz sea L-valina, Cc no sea L-alanina;

a condición de que cuando Xx sea sarcosina, Ww sea una L-tirosina y Zz sea L-isoleucina, Cc no sea L-alanina;

Según algunas realizaciones, los compuestos comprenden la siguiente fórmula:

10 Xx-Arg-Val-Ww-Zz-His-Pro-Cc,

en la que Xx es sarcosina, N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina, N,N-dimetilglicina, ácido L-aspártico, ácido D-aspártico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico, ácido N-metil-L-aspártico, ácido N-metil-L-glutámico, ácido pirrolid-1-ilacético o ácido morfolin-4-ilacético; Ww es L-isoleucina, glicina, L-tirosina, O-metil-L-tirosina, L-valina, L-fenilalanina, 3-hidroxi-L-tirosina, 2,6-dimetil-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 4-fluorofenil-L-alanina, 2,6-difluoro-L-tirosina, 3-nitro-L-tirosina, 3,5-dinitro-L-tirosina, 3,5-dibromo-L-tirosina, 3-cloro-L-tirosina, O-alil-L-tirosina o 3,5-diyodo-L-tirosina; Zz es L-isoleucina, L-valina, L-tirosina, ácido L-glutámico, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-arginina, O-metil-L-treonina, D-alanina, o L-norvalina; y Cc es L-isoleucina, L-isoleucina-amida, glicina, glicina-amida, L-alanina, L-alanina-amida, D-alanina, D-fenilalanina, L-norvalina.

15 a condición de que cuando Xx sea ácido L-aspártico, Cc no sea L-fenilalanina;

20 a condición de que cuando Xx sea sarcosina, Cc no sea L-isoleucina;

a condición de que cuando Ww sea glicina, Cc no sea glicina;

a condición de que cuando Xx sea sarcosina y Zz sea L-valina, Cc no sea L-alanina;

a condición de que cuando Xx sea sarcosina, Ww sea una L-tirosina y Zz sea L-isoleucina, Cc no sea L-alanina;

Según algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención comprenden la siguiente fórmula:

25 Sar-Arg-Val-Ww-Zz-His-Pro-Cc,

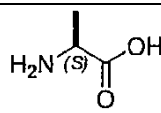
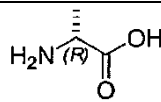
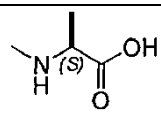
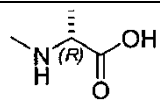
en la que Ww es L-tirosina, 3-hidroxi-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 2,6-difluoro-L-tirosina, 3-nitro-L-tirosina, 3,5-dinitro-L-tirosina, 3-cloro-L-tirosina; Zz es L-valina o L-isoleucina; y Cc es D-alanina.

Según algunas realizaciones, los compuestos comprenden la siguiente fórmula:

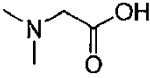
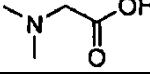
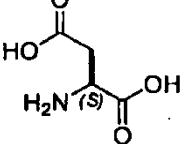
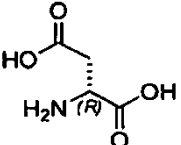
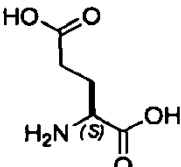
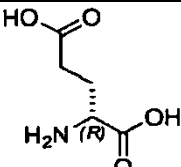
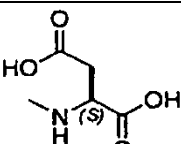
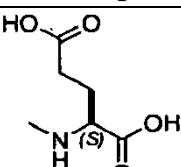
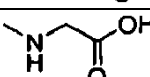
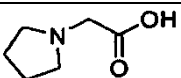
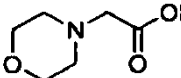
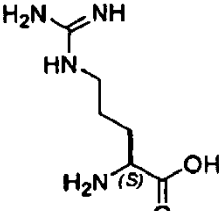
Sar-Arg-Val-Ww-OMTh-His-Pro-Cc,

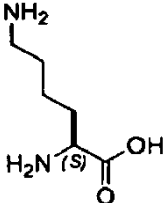
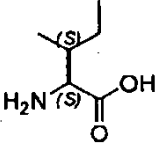
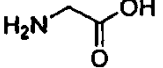
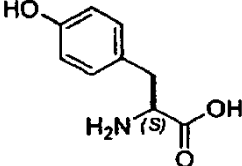
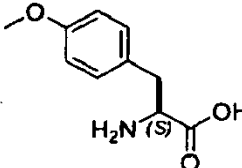
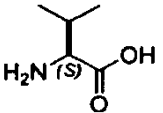
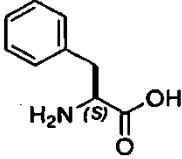
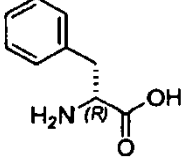
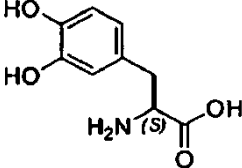
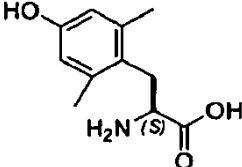
30 en la que Ww es L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 3-cloro-L-tirosina; y Cc es D-alanina o L-alanina.

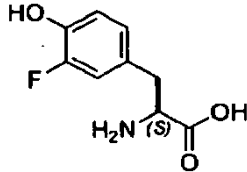
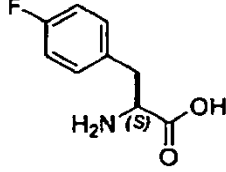
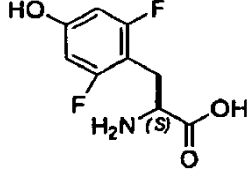
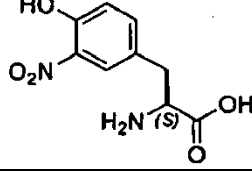
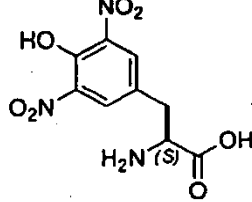
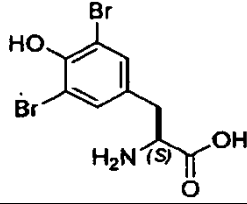
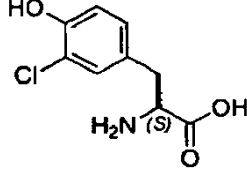
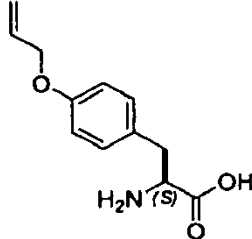
La definición de algunas de las abreviaturas usadas se facilita a continuación:

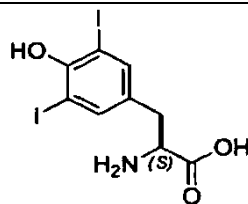
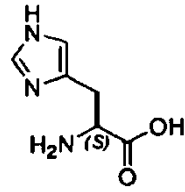
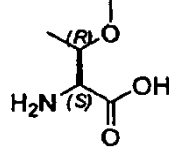
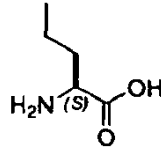
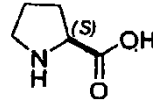
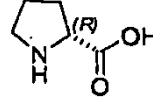
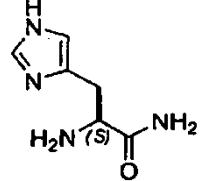
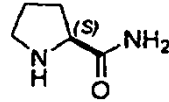
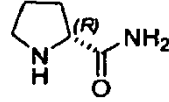
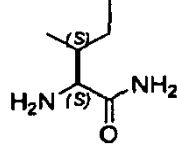
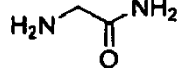
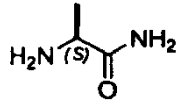
Abreviatura	Nombre químico del aminoácido o su análogo	Estructura del aminoácido o su análogo
Ala	L-Alanina	
D-Ala	D-Alanina	
NMAla	N-Metil-L-alanina	
NM-D-Ala	N-Metil-D-alanina	



Abreviatura	Nombre químico del aminoácido o su análogo	Estructura del aminoácido o su análogo
Me2G	N,N-dimetilglicina	
Me2G	N,N-dimetilglicina	
Asp	Ácido L-aspártico	
D-Asp	Ácido D-aspártico	
Glu	Ácido L-glutámico	
D-Glu	Ácido D-glutámico	
N-Me-Asp	Ácido N-metil-L-aspártico	
N-Me-Glu	Ácido N-metil-L-glutámico	
Sar	Sarcosina	
MMM	Ácido pirrolid-1-ilacético	
NNN	Ácido morfolin-4-ilacético	
Arg	L-Arginina	

Abreviatura	Nombre químico del aminoácido o su análogo	Estructura del aminoácido o su análogo
Lys	L-Lisina	
Ile	L-Isoleucina	
Gly	Glicina	
Tyr	L-Tirosina	
OMTyr	O-Metil-L-tirosina	
Val	L-Valina	
Phe	L-Fenilalanina	
D-he	D-Fenilalanina	
AAA	3-Hidroxi-L-tirosina	
BBB	2,6-Dimetil-L-tirosina	

Abreviatura	Nombre químico del aminoácido o su análogo	Estructura del aminoácido o su análogo
CCC	3-Fluoro-L-tirosina	
DDD	4-Fluorofenil-L-alanina	
EEE	2,6-Difluoro-L-tirosina	
FFF	3-Nitro-L-tirosina	
GGG	3,5-Dinitro-L-tirosina	
HHH	3,5-Dibromo-L-tirosina	
III	3-Cloro-L-tirosina	
JJJ	O-Alil-L-tirosina	

Abreviatura	Nombre químico del aminoácido o su análogo	Estructura del aminoácido o su análogo
OOO	3,5-Diyodo-L-tirosina	
His	L-Histidina	
OMTh	O-Metil-L-treonina	
NVA	L-Norvalina	
Pro	L-Prolina	
D-Pro	D-Prolina	
	L-Histidina-amida	
	L-Prolina-amida	
	D-Prolina-amida	
	L-Isoleucina-amida	
	Glicina-amida	
	L-Alanina-amida	

5 Pueden prepararse formas cíclicas, formas truncadas cíclicas, formas dimerizadas truncadas cíclicas y formas trimerizadas truncadas cíclicas de los compuestos de las fórmulas anteriores usando cualquier método conocido. Truncado se define como análogos con aminoácidos eliminados de los residuos X1 y/o X2 como se representa en la Tabla 1. Según algunas realizaciones, las formas cíclicas de los compuestos de las fórmulas anteriores pueden prepararse conectando grupos amino libres y carboxilo libres. Según algunas realizaciones, la formación de los compuestos cíclicos puede realizarse convencionalmente mediante tratamiento con un agente deshidratante por medios conocidos en la técnica, con protección adecuada si se necesita. Según algunas realizaciones, la cadena abierta (forma lineal) para la reacción de forma cíclica puede implicar una isomerización en trans a cis de la prolina. Según algunas realizaciones, la cadena abierta (forma lineal) para la reacción de forma cíclica puede implicar ciclación intramolecular.

10 Ejemplos de los compuestos incluyen, pero no se limitan a, los compuestos enumerados en la Tabla 1 a continuación. Los compuestos de la presente invención se indican por \*:

Tabla 1.

SEC ID N°:	Residuo (X)								
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	
AngII	Asp	Arg	Val	Tyr	He	His	Pro	Phe	OH
2	Sar	Arg	Val	Ile	Ile	His	Pro	Ile	NH <sub>2</sub>
3	Sar	Arg	Val	Ile	Val	His	Pro	Ile	OH
5	Sar	Arg	Val	Gly	Val	His	Pro	Gly	OH
6	Sar	Arg	Val	Gly	Val	His	Pro	Gly	NH <sub>2</sub>
7	Sar	Arg	Val	Tyr	Val	His	Pro	Ala	OH
8	Sar	Arg	Val	Tyr	Val	His	Pro	Ala	NH <sub>2</sub>
9	Sar	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Ala	OH
10	Sar	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Ala	NH <sub>2</sub>
11	Sar	Arg	Val	Tyr	Val	His	Pro	Ile	OH
12	Sar	Arg	Val	Tyr	Val	His	Pro	Ile	NH <sub>2</sub>
13		Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
14	Sar	Arg	Val	Tyr	Tyr	His	Pro	He	OH
15	Sar	Arg	Val	Tyr	Tyr	His	Pro	Ile	NH <sub>2</sub>
16	Sar	Arg	Val	Tyr	Glu	His	Pro	Ile	OH
19	Sar	Arg	Val	Tyr	Tyr	His	Pro	Ala	OH
20	Sar	Arg	Val	Tyr	Glu	His	Pro	Ala	OH
21	Sar	Arg	Val	Tyr	Phe	His	Pro	Ala	OH
22	Sar	Arg	Val	Tyr	His	His	Pro	Ala	OH
23	Sar	Arg	Val	Tyr	Lys	His	Pro	Ala	OH
24	Sar	Arg	Val	Tyr	Arg	His	Pro	Ala	OH
25	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Ala	OH

ES 2 558 629 T3

SEC ID Nº:	Residuo (X)								
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	
26	Sar	Arg	Val	Tyr	Tyr	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
27*	Sar	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	D-Ala	OH
28	Sar	Arg	Val	Tyr	Tyr	His	Pro	D-Phe	OH
29	Sar	Arg	Val	OMTyr	Ile	His	Pro	Ala	OH
30	Sar	Arg	Val	Tyr	OMTh	His	Pro	Ala	OH
31	Me2G	Arg	Val	Tyr	Val	His	Pro	Ala	OH
32	Me2G	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Ala	OH
33	NMAIa	Arg	Val	Tyr	Val	His	Pro	Ala	OH
34	NMAIa	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Ala	OH
35	Sar	Arg	Val	Tyr	He	His	Pro	NVA	OH
36	Ciclo(Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro)								
37	Ciclo(Phe-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-Val-Tyr-Ile-His-Pro)								
38	Ciclo(Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)								
40	Sar	Arg	Val	Tyr	Glu	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
41	Sar	Arg	Val	Tyr	Phe	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
42	Sar	Arg	Val	Tyr	His	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
43	Sar	Arg	Val	Tyr	Lys	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
44	NMAIa	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	D-Ala	OH
45	Sar	Arg	Val	Tyr	Arg	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
46	NMAIa	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	D-Ala	OH
47	NM-D-Ala	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Ala	OH
48	Sar	Arg	Val	Phe	Ile	His	Pro	D-Ala	OH
49	Sar	Lys	Val	Tyr	Ile	His	Pro	D-Ala	OH
50	Sar	Arg	Val	Tyr	Ile	Lys	Pro	D-Ala	OH
51	Sar	Arg	Val	Tyr	Ile	His	D-Pro	NH <sub>2</sub>	
52	Sar	Arg	Val	Tyr	Tyr	His	Pro	OH	
53	Sar	Arg	Val	Tyr	D-Ala	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
54	Sar	Arg	Val	Tyr	Val	His	Pro	OH	
55	Sar	Arg	Val	Tyr	Val	His	NH <sub>2</sub>		
56	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Gly	OH

ES 2 558 629 T3

SEC ID N°:	Residuo (X)								
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	
57	Asp	Arg	Val	Tyr	Tyr	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
58	D-Asp	Arg	Val	Tyr	Tyr	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
59	Glu	Arg	Val	Tyr	Tyr	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
60	D-Glu	Arg	Val	Tyr	Tyr	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
61	N-Me-Asp	Arg	Val	Tyr	Tyr	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
62	N-Me-Glu	Arg	Val	Tyr	Tyr	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
63	Asp	Arg	Val	Tyr	Phe	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
64	Glu	Arg	Val	Tyr	Phe	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
65	N-Me-Asp	Arg	Val	Tyr	Phe	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
66	N-Me-Glu	Arg	Val	Tyr	Phe	His	Pro	NH <sub>2</sub>	
67*	Sar	Arg	Val	AAA	Ile	His	Pro	D-Ala	OH
68	Sar	Arg	Val	BBB	Ile	His	Pro	D-Ala	OH
69*	Sar	Arg	Val	CCC	Ile	His	Pro	D-Ala	OH
70	Sar	Arg	Val	DDD	He	His	Pro	D-Ala	OH
71*	Sar	Arg	Val	EEE	Ile	His	Pro	D-Ala	OH
72*	Sar	Arg	Val	FFF	Ile	His	Pro	D-Ala	OH
73*	Sar	Arg	Val	GGG	Ile	His	Pro	D-Ala	OH
74	Sar	Arg	Val	HHH	Ile	His	Pro	D-Ala	OH
75*	Sar	Arg	Val	III	He	His	Pro	D-Ala	OH
76	Sar	Arg	Val	JJJ	Ile	His	Pro	D-Ala	OH
77	Sar	Arg	Val	AAA	OMTh	His	Pro	Ala	OH
78	Sar	Arg	Val	CCC	OMTh	His	Pro	Ala	OH
79	Sar	Arg	Val	III	OMTh	His	Pro	Ala	OH
80	MMM	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	D-Ala	OH
81	NNN	Arg	Val	Tyr	He	His	Pro	D-Ala	OH
82	NM-D-Ala	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	D-Ala	OH
83	Sar	Arg	Val	Tyr	NVA	His	Pro	D-Ala	OH
84	Sar	Arg	Val	Tyr	OMTh	His	Pro	D-Ala	OH
85	Sar	Arg	Val	OOO	He	His	Pro	D-Ala	OH

La definición del aminoácido o sus análogos, por favor véase la tabla de abreviaturas.

**Determinación de la actividad de GPCR**

Los compuestos de las realizaciones preferidas son agonistas de la transducción de señales mediada por  $\beta$ -arrestina/GRK mediante el receptor de angiotensina AT1. La capacidad de los compuestos para efectuar la señalización mediada por la proteína G puede medirse usando cualquier ensayo conocido en la técnica usado para detectar la señalización mediada por la proteína G o actividad de GPCR, o la ausencia de tal señalización/actividad. "Actividad de GPCR" se refiere a la capacidad de un GPCR de transducir una señal. Tal actividad puede medirse, por ejemplo, en una célula heteróloga, acoplando un GPCR (o un GPCR quimérico) a una proteína G y un efector aguas abajo tal como PLC o adenilato ciclasa, y midiendo aumentos en el calcio intracelular (véase, por ejemplo, Offermans & Simon, J. Biol. Chem. 270:15175-15180 (1995)). La actividad de receptor puede medirse eficazmente registrando los cambios inducidos por ligando en  $[Ca^{2+}]_i$  usando colorantes indicadores de  $Ca^{2+}$  fluorescentes y obtención de imágenes fluorimétrica. Una "actividad inducida por ligando natural", como se usa en el presente documento, se refiere a la activación de GPCR por un ligando natural de GPCR. La actividad puede evaluarse usando cualquier número de criterios de valoración para medir la actividad de GPCR. Por ejemplo, la actividad de un GPCR puede evaluarse usando un ensayo tal como movilización de calcio, por ejemplo, un ensayo de luminiscencia de aequorina.

Generalmente, los ensayos para probar compuestos que modulan la transducción de señales mediada por GPCR incluyen la determinación de cualquier parámetro que esté indirecta o directamente bajo la influencia de un GPCR, por ejemplo, un efecto funcional, físico o químico. Incluye unión a ligando, cambios en el flujo de iones, potencial de membrana, flujo de corriente, transcripción, unión de proteína G, amplificación génica, expresión en células cancerosas, fosforilación o desfosforilación de GPCR, transducción de señales, interacciones receptor-ligando, concentraciones del segundo mensajero (por ejemplo, AMPc, GMPc,  $IP_3$ , DAG o  $Ca^{2+}$  intracelular), *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, y también incluye otros efectos fisiológicos tales como aumento o disminución de la liberación de neurotransmisor u hormona; o aumento en la síntesis de compuestos particulares, por ejemplo, triglicéridos. Tales parámetros pueden medirse mediante cualquier medio conocido para aquellos expertos en la materia, por ejemplo, cambios en las características espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice de refracción), propiedades hidrodinámicas (por ejemplo, forma), cromatográficas o de solubilidad, pinzamiento zonal de membrana, colorantes sensibles al voltaje, corrientes de células completas, salida de radioisótopos, marcadores inducibles, activación transcripcional de GPCR; ensayos de unión a ligando; voltaje, potencial de membrana y cambios de la conductancia; ensayos de flujo de iones; cambios en los segundos mensajeros intracelulares tales como AMPc y trifosfato de inositol ( $IP_3$ ); cambios en los niveles de calcio intracelular; liberación de neurotransmisores, y similares.

Cuando un receptor de proteína G se vuelve activo, se une a una proteína G (por ejemplo, Gq, Gs, Gi, Go) y estimula la unión de GTP a la proteína G. La proteína G actúa entonces de GTPasa e hidroliza lentamente la GTP a GDP, por lo que el receptor, bajo condiciones normales, se desactiva. La señalización mediada por la proteína G o la actividad de GPCR pueden medirse usando sistemas de ensayo que son capaces de detectar y/o medir la unión de GTP y/o hidrólisis de GTP a GDP.

Gs estimula la enzima adenilil ciclasa. Gi (y Go), por otra parte, inhiben esta enzima. La adenilil ciclasa cataliza la conversión de ATP a AMPc. Así, GPCR constitutivamente activados que se acoplan a la proteína Gs están asociados a elevados niveles celulares de AMPc. Por otra parte, GPCR activados que se acoplan a la proteína Gi (o Go) están asociados a reducidos niveles celulares de AMPc. Así, los ensayos que detectan AMPc pueden utilizarse para determinar si un compuesto candidato es, por ejemplo, un agonista inverso para el receptor (es decir, un compuesto tal disminuiría los niveles de AMPc). Puede utilizarse una variedad de enfoques conocidos en la técnica para medir AMPc; un enfoque más preferido se basa en el uso de anticuerpos anti-AMPc en un formato basado en ELISA. Otro tipo de ensayo que puede utilizarse es un ensayo de sistema de indicador de segundo mensajero de célula completa. Los promotores en genes conducen la expresión de las proteínas que codifican un gen particular. El AMP cíclico conduce la expresión génica, promoviendo la unión de una proteína de unión de ADN sensible a AMPc o factor de transcripción (CREB) que entonces se une a un promotor en sitios específicos llamados elementos de respuesta de AMPc y conduce la expresión del gen. Pueden construirse sistemas indicadores que tienen un promotor que contiene múltiples elementos de respuesta de AMPc antes del gen indicador, por ejemplo,  $\beta$ -galactosidasa o luciferasa. Así, un receptor asociado a G activado constitutivamente activado produce la acumulación de AMPc, que entonces activa el gen y la expresión de la proteína indicadora. La proteína indicadora tal como  $\beta$ -galactosidasa o luciferasa puede entonces detectarse usando ensayos bioquímicos estándar.

Gq y Go están asociadas a la activación de la enzima fosfolipasa C, que a su vez hidroliza el fosfolípido PIP2, liberando dos mensajeros intracelulares: diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato de ( $IP_3$ ). La elevada acumulación de  $IP_3$  está asociada a la activación de receptores asociados a Gq y Go. Pueden utilizarse ensayos que detectan la acumulación de  $IP_3$  para determinar si un compuesto candidato es, por ejemplo, un agonista inverso para un receptor asociado a Gq o Go (es decir, un compuesto tal disminuiría los niveles de  $IP_3$ ). También pueden examinarse receptores dependientes de Gq usando un ensayo de indicador AP1 en el que la fosfolipasa C dependiente de Gq produce la activación de genes que contienen elementos AP1.

Muestras o ensayos que comprenden GPCR que se tratan con un posible activador, inhibidor o modulador se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador para examinar el grado de inhibición. A las



muestras de control (sin tratar con inhibidores) se les asigna un valor de actividad relativa de GPCR del 100 %. La inhibición de un GPCR se logra cuando el valor de actividad de GPCR con respecto al control es aproximadamente el 80 %, preferentemente el 50 %, más preferentemente el 25 %. La activación de un GPCR se logra cuando el valor de actividad de GPCR con respecto al control (sin tratar con activadores) es del 110 %, más preferentemente del 150 %, más preferentemente del 200-500 % (es decir, dos a cinco veces mayor con respecto al control), más preferentemente 1000-3000 % o superior.

Los efectos de los compuestos tras la función de los polipéptidos GPCR pueden medirse examinando cualquiera de los parámetros descritos anteriormente. Puede usarse cualquier cambio fisiológico adecuado que afecte la actividad de GPCR para evaluar la influencia de un compuesto sobre los GPCR y la actividad de GPCR mediada por ligando natural. Cuando se determinan las consecuencias funcionales usando células o animales intactos, también puede medirse una variedad de efectos tales como la liberación de transmisores, liberación de hormonas, cambios transcripcionales a tanto marcadores genéticos conocidos como sin caracterizar (por ejemplo, transferencias Northern), cambios en el metabolismo de las células tales como crecimiento celular o cambios de pH, y cambios en los segundos mensajeros intracelulares tales como  $Ca^{2+}$ , IP3 o AMPc.

Para una revisión general de la transducción de señales de GPCR y métodos de ensayo de la transducción de señales véase, por ejemplo, *Methods in Enzymology*, vols. 237 y 238 (1994) y volumen 96 (1983); Bourne et al., *Nature* 10:349:117 27 (1991); Bourne et al., *Nature* 348:125 32 (1990); Pitcher et al., *Annu. Rev. Biochem.* 67:653 92 (1998).

Los moduladores de actividad de GPCR se prueban usando polipéptidos GPCR como se ha descrito anteriormente, tanto recombinantes como que existen de forma natural. La proteína puede aislarse, expresarse en una célula, expresarse en una membrana derivada de una célula, expresarse en tejido o en un animal. Por ejemplo, pueden usarse adipocitos, células del sistema inmunitario, células transformadas, o membranas, para probar los polipéptidos GPCR descritos anteriormente. La modulación se prueba usando uno de los ensayos *in vitro* o *in vivo* descritos en el presente documento. La transducción de señales también puede examinarse *in vitro* con reacciones solubles o en estado sólido, usando una molécula quimérica tal como un dominio extracelular de un receptor ligado covalentemente a un dominio heterólogo de transducción de señales, o un dominio extracelular heterólogo ligado covalentemente al dominio transmembranario y o citoplásmico de un receptor. Además, los dominios de unión a ligando de la proteína de interés pueden usarse *in vitro* en reacciones solubles o en estado sólido para ensayar la unión del ligando.

La unión del ligando a un GPCR, un dominio, o proteína quimérica, puede probarse en varios formatos. La unión puede realizarse en disolución, en una membrana bicapa, unida a una fase sólida, en una monocapa lipídica, o en vesículas. Normalmente, en un ensayo de la invención, la unión del ligando natural a su receptor se mide en presencia de un modulador candidato. Alternativamente, la unión del modulador candidato puede medirse en presencia del ligando natural. Frecuentemente, se usan ensayos competitivos que miden la capacidad de un compuesto para competir con la unión del ligando natural al receptor. La unión puede probarse midiendo, por ejemplo, cambios en características espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice de refracción), cambios hidrodinámicos (por ejemplo, forma), o cambios en propiedades cromatográficas o de solubilidad.

También pueden usarse interacciones receptor-proteína G para ensayar moduladores. Por ejemplo, en ausencia de GTP, la unión de un activador tal como el ligando natural conducirá a la formación de un estrecho complejo de una proteína G (las tres subunidades) con el receptor. Este complejo puede detectarse en una variedad de formas, como se observa anteriormente. Un ensayo tal puede modificarse para buscar inhibidores. Por ejemplo, el ligando puede añadirse al receptor y la proteína G en ausencia de GTP para formar un estrecho complejo. Pueden identificarse inhibidores o antagonistas observando la disociación del complejo de receptor-proteína G. En presencia de GTP, la liberación de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G de las otras dos subunidades de proteína G sirve de criterio de activación.

Una proteína G activada o inhibida alterará a su vez las propiedades de efectores aguas abajo tales como proteínas, enzimas y canales. Los ejemplos clásicos son la activación de fosfodiesterasa de GMPC por transducina en el sistema visual, adenilato ciclasa por la proteína G estimulante, fosfolipasa C por Gq y otras proteínas G relacionadas, y la modulación de diversos canales por Gi y otras proteínas G. También pueden examinarse las consecuencias aguas abajo tales como la generación de diacil glicerol y IP3 por fosfolipasa C, y a su vez, para la movilización de calcio, por ejemplo, por IP3 (adicionalmente tratado más adelante). Así, pueden evaluarse moduladores para la capacidad para estimular o inhibir los efectos aguas abajo mediados por ligando. Pueden evaluarse moduladores candidatos para la capacidad para inhibir la movilización de calcio inducida por ácido nicotínico o un compuesto relacionado que activa el receptor.

En otros ejemplos, la capacidad de un compuesto para inhibir la actividad de GPCR puede determinarse usando ensayos aguas abajo tales como midiendo la lipólisis en adipocitos, liberación de ácidos grasos libres de tejido adiposo, y actividad de lipoproteína lipasa. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando un ensayo de competición en el que cantidades variables de un compuesto se incuban con un GPCR.

Por tanto, también pueden identificarse moduladores usando ensayos que implican reclutamiento de  $\beta$ -arrestina. La  $\beta$ -arrestina sirve de proteína reguladora que está distribuida por todo el citoplasma en células inactivadas. La unión de ligando a un GPCR apropiado está asociada a la redistribución de  $\beta$ -arrestina del citoplasma a la superficie celular, donde se asocia con el GPCR. Así, la activación del receptor y el efecto de moduladores candidatos sobre la activación de receptores inducida por ligando puede evaluarse monitorizando el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina a la superficie celular. Esto se realiza frecuentemente transfectando una proteína de fusión de  $\beta$ -arrestina marcada (por ejemplo,  $\beta$ -arrestina-proteína verde fluorescente (GFP)) en células y monitorizando su distribución usando microscopía confocal (véase, por ejemplo, Groarke et al., *J. Biol. Chem.* 274(33):23263-69 (1999)).

También pueden usarse ensayos de internalización de receptor para evaluar la función del receptor. Tras la unión del ligando, el complejo receptor-ligando acoplado a la proteína G se internaliza desde la membrana plasmática por un proceso endocítico vesicular recubierto de clatrina; los motivos de internalización sobre los receptores se unen a complejos de proteína adaptadora y median en el reclutamiento de los receptores activados, es posible detectar la unión de ligando-receptor determinando la cantidad de receptor internalizado. En un formato de ensayo, las células se transfectan transitoriamente con receptor radiomarcado y se incuban durante un periodo de tiempo apropiado para permitir la unión del ligando y la internalización del receptor. A partir de aquí, la radiactividad unida a la superficie se elimina lavando con una disolución de ácido, las células se solubilizan y la cantidad de radiactividad internalizada se calcula como un porcentaje de unión del ligando. Véase, por ejemplo, Vrecl et al., *Mol. Endocrinol.* 12:1818-29 (1988) y Conway et al., *J. Cell Physiol.* 189(3):341-55 (2001). Además, los enfoques de internalización de receptor han permitido mediciones ópticas en tiempo real de interacciones de GPCR con otros componentes celulares en células vivas (véase, por ejemplo, Barak et al., *Mol. Pharmacol.* 51(2):177-84 (1997)). Los moduladores pueden identificarse comparando los niveles de internalización de receptor en células de control y células puestas en contacto con compuestos candidatos.

Otra tecnología que puede usarse para evaluar las interacciones GPCR-proteína en células vivas implica transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET). Una discusión detallada referente a BRET puede encontrarse en Kroeger et al., *J. Biol. Chem.*, 276(16):12736-43 (2001).

La unión de guanosina 5'-O-( $\gamma$ -tio)-trifosfato ( $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ ) estimulada por receptor a proteínas G también puede usarse como ensayo para evaluar moduladores de GPCR.  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  es un análogo de GTP radiomarcado que tiene una alta afinidad por todos los tipos de proteínas G, está disponible con una alta actividad específica y, aunque es inestable en la forma sin unir, no es hidrolizado cuando se une a la proteína G. Así, es posible evaluar cuantitativamente el receptor unido a ligando comparando la unión de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  estimulado frente a sin estimular utilizando, por ejemplo, un contador de centelleo líquido. Los inhibidores de las interacciones receptor-ligando producirían disminución de la unión de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ . Descripciones de ensayos de unión de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  se proporcionan en Traynor y Nahorski, *Mol. Pharmacol.* 47(4):848-54 (1995) y Bohn et al., *Nature* 408:720-23 (2000).

También puede determinarse la capacidad de los moduladores para afectar el flujo de iones inducido por ligando. El flujo de iones puede evaluarse determinando cambios en la polarización (es decir, potencial eléctrico) de la célula o membrana que expresa un GPCR. Un medio para determinar cambios en la polarización celular es midiendo cambios en la corriente (midiendo así cambios en la polarización) con técnicas de pinzamiento de voltaje y de pinzamiento zonal de membrana, por ejemplo, el modo "unido a célula", el modo "al revés" y el modo "célula completa" (véase, por ejemplo, Ackerman et al., *New Engl. J. Med.* 336:1575-1595 (1997)). Las corrientes de células completas se determinan convenientemente usando la metodología estándar (véase, por ejemplo, Hamil et al., *Pflugers. Archiv.* 391:85 (1981)). Otros ensayos conocidos incluyen: ensayos de flujo de iones radiomarcados y ensayos de fluorescencia usando colorantes sensibles al voltaje (véase, por ejemplo, Vestergaard-Bogind et al., *J. Membrane Biol.* 88:67-75 (1988); Gonzales & Tsien, *Chem. Biol.* 4:269-277 (1997); Daniel et al., *J. Pharmacol. Meth.* 25:185-193 (1991); Holevinsky et al., *J. Membrane Biology* 137:59-70 (1994)). Generalmente, los compuestos que van a probarse están presentes en el intervalo de 1 pM a 100 mM.

Ensayos preferidos para los receptores acoplados a la proteína G incluyen células que se cargan con colorantes sensibles a iones o al voltaje para indicar actividad de receptor. Los ensayos para determinar la actividad de tales receptores también pueden usar agonistas y antagonistas conocidos para otros receptores acoplados a proteína G y los ligandos naturales desvelados en el presente documento como controles negativos o positivos para evaluar la actividad de compuestos probados. En ensayos para identificar compuestos moduladores (por ejemplo, agonistas, antagonistas), se monitorizan los cambios en el nivel de iones en el voltaje del citoplasma o membrana usando un indicador fluorescente de voltaje sensible a iones o de membrana, respectivamente. Entre los indicadores sensibles a iones y las sondas de voltaje que pueden emplearse están los desvelados en *Molecular Probes 1997 Catalog*. Para los receptores acoplados a proteína G pueden usarse las proteínas G promiscuas tales como  $G\alpha_{15}$  y  $G\alpha_{16}$  en el ensayo de elección (Wilkie et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88:10049-10053 (1991)). Tales proteínas G promiscuas permiten el acoplamiento de una amplia variedad de receptores a las vías de transducción de señales en células heterólogas.

Como se observa anteriormente, la activación de receptores por la unión del ligando normalmente inicia los posteriores acontecimientos intracelulares, por ejemplo, aumenta en los segundos mensajeros tales como IP<sub>3</sub>, que libera las reservas intracelulares de iones calcio. La activación de algunos receptores acoplados a la proteína G

estimula la formación de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) mediante la hidrólisis mediada por fosfolipasa C de fosfatidilinositol (Berridge & Irvine, Nature 312:315 21 (1984)). IP<sub>3</sub> estimula a su vez la liberación de las reservas de ión calcio intracelular. Así, puede usarse un cambio en los niveles de ión calcio citoplásmico, o un cambio en los niveles de segundo mensajero tales como IP<sub>3</sub>, para evaluar la función de receptores acoplados a la proteína G. Las células que expresan tales receptores acoplados a la proteína G pueden presentar elevados niveles de calcio citoplásmico como resultado de la contribución de tanto las reservas intracelulares como mediante la activación de canales de iones, en cuyo caso puede ser deseable, aunque no necesario, realizar tales ensayos en tampón libre de calcio, opcionalmente complementado con un agente quelante tal como EGTA, para distinguir la respuesta de fluorescencia resultante de la liberación de calcio de las reservas internas.

Otros ensayos pueden implicar determinar la actividad de receptores que, cuando se activan por la unión del ligando, producen un cambio en el nivel de nucleótidos cíclicos intracelulares, por ejemplo, AMPc o GMPc, activando o inhibiendo efectores aguas abajo tales como la adenilato ciclasa. En una realización, los cambios en AMPc o GMPc intracelular pueden medirse usando inmunoensayos. El método descrito en Offermanns & Simon, J. Biol. Chem. 270:15175 15180 (1995) puede usarse para determinar el nivel de AMPc. Por tanto, el método descrito en Felley-Bosco et al., Am. J. Resp. Cell and Mol. Biol. 11:159 164 (1994) puede usarse para determinar el nivel de GMPc. Además, se describe un kit de ensayo para medir AMPc y/o GMPc en la patente de EE.UU. N° 4.115.538.

En otra realización puede analizarse la hidrólisis de fosfatidil inositol (PI) según la patente de EE.UU. N° 5.436.128. Brevemente, el ensayo implica marcar de células con <sup>3</sup>H-mioinositol durante 48 o más h. Las células marcadas se tratan con un compuesto durante una hora. Las células tratadas se lisan y se extraen en cloroformo-metanol-agua después de que los inositol fosfatos se separen por cromatografía de intercambio iónico y se cuantifiquen por recuento por centelleo. Las veces de estimulación se determinan calculando la relación de recuentos por minuto (cpm) en presencia de agonista con respecto a las cpm en presencia de control de tampón. Asimismo, las veces de inhibición se determinan calculando la relación de cpm en presencia de antagonista con respecto a cpm en presencia de control de tampón (que puede o puede no contener un agonista).

En otra realización, los niveles de transcripción pueden medirse para evaluar los efectos de un compuesto de prueba sobre la transducción de señales inducida por ligando. Una célula huésped que contiene la proteína de interés se pone en contacto con un compuesto de prueba en presencia del ligando natural durante un tiempo suficiente para efectuar cualquier interacción, y entonces se mide el nivel de expresión génica. La cantidad de tiempo para efectuar tales interacciones puede determinarse empíricamente, tal como ejecutando un trascurso de tiempo y midiendo el nivel de transcripción en función del tiempo. La cantidad de transcripción puede medirse usando cualquier método conocido para aquellos expertos en la materia por ser adecuado. Por ejemplo, puede detectarse la expresión de ARNm de la proteína de interés usando transferencias Northern o sus productos de polipéptido pueden identificarse usando inmunoensayos. Alternativamente, pueden usarse ensayos basados en transcripción usando genes indicadores como se describe en la patente de EE.UU. N° 5.436.128. Los genes indicadores pueden ser, por ejemplo, cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa de luciérnaga, luciferasa bacteriana, β-galactosidasa y fosfatasa alcalina. Además, la proteína de interés puede usarse como indicador indirecto mediante la unión a un segundo indicador tal como proteína verde fluorescente (véase, por ejemplo, Mistili & Spector, Nature Biotechnology 15:961 964 (1997)).

La cantidad de transcripción se compara entonces con la cantidad de transcripción en tanto la misma célula en ausencia del compuesto de prueba, como puede compararse con la cantidad de transcripción en una célula sustancialmente idéntica que carece de la proteína de interés. Una célula sustancialmente idéntica puede derivarse de las mismas células a partir de las cuales se preparó la célula recombinante, pero que no se habían modificado por la introducción de ADN heterólogo. Cualquier diferencia en la cantidad de transcripción indica que el compuesto de prueba tiene alterada de alguna manera la actividad de la proteína de interés.

Las muestras que se tratan con un antagonista de GPCR se comparan con muestras de control que comprenden el ligando natural sin el compuesto de prueba para examinar el grado de modulación. A las muestras de control (sin tratar con activadores o inhibidores) se les asigna un valor de actividad de GPCR relativo de 100. La inhibición de un GPCR se logra cuando el valor de actividad de GPCR con respecto al control es aproximadamente el 90 %, opcionalmente el 50 %, u opcionalmente el 25 %. La activación de un GPCR se logra cuando el valor de actividad de GPCR con respecto al control es del 110 %, opcionalmente del 150 %, 200-500 %, o 1000-2000 %.

#### **Determinación de la transducción de señales mediada por β-arrestina/GRK**

La capacidad de los compuestos de la presente invención para activar la transducción de señales mediada por β-arrestina/GRK mediante el receptor de angiotensina AT1 puede medirse usando cualquier ensayo conocido en la técnica usado para detectar la transducción de señales mediada por β-arrestina/GRK mediante el receptor de angiotensina AT1, o la ausencia de tal transducción de señales. Generalmente, los GPCR activados se convierten en sustratos para las cinasas que fosforilan la cola del extremo C del receptor (y posiblemente también otros sitios). Así, un antagonista inhibirá la transferencia de <sup>32</sup>P de GTP marcada con gamma al receptor, que puede ensayarse con un contador de centelleo. La fosforilación de la cola del extremo C promoverá la unión de proteínas tipo arrestina e interferirá con la unión de proteínas G. La vía de cinasa/arrestina desempeña una función clave en la desensibilización de muchos receptores GPCR.

El acontecimiento proximal en la función de  $\beta$ -arrestina mediada por GPCR es el reclutamiento para receptores tras la unión del ligando y la fosforilación del receptor por GRK. Así, se usó la medida del reclutamiento de  $\beta$ -arrestina para determinar la eficacia del ligando para la función de  $\beta$ -arrestina.

**Péptidos, derivados y miméticos**

5 Los términos “peptidilo” y “peptídico”, como se usan en toda la memoria descriptiva y reivindicaciones, pretenden incluir derivados activos, variantes y/o miméticos de los péptidos según las presentes realizaciones. Los compuestos peptídicos son equivalentes bioactivos estructuralmente similares de los péptidos según las presentes realizaciones. Por un “equivalente bioactivo estructuralmente similar” se indica un compuesto de peptidilo con estructura suficientemente similar a la de un péptido bioactivo identificado para producir efectos terapéuticos sustancialmente  
 10 equivalentes. Por ejemplo, los compuestos peptídicos derivados de la secuencia de aminoácidos del péptido, o que tienen un esqueleto de secuencia de aminoácidos del péptido, se consideran equivalentes bioactivos estructuralmente similares del péptido.

El término “variante” se refiere a una proteína o polipéptido en la que una o más sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones están presentes en comparación con la secuencia de aminoácidos de una proteína o péptido e incluye variantes alélicas que existen de forma natural o variantes de corte y empalme alternativas de una proteína o péptido. El término “variante” incluye la sustitución de uno o más aminoácidos en una secuencia de péptidos con un aminoácido(s) similar u homólogo o un aminoácido(s) distinto. Variantes preferidas incluyen sustituciones de alanina en una o más de las posiciones de aminoácidos. Otras sustituciones preferidas incluyen sustituciones conservativas que tienen poco o ningún efecto sobre la carga neta global, polaridad o hidrofobia de la  
 15 proteína. Las sustituciones conservativas se exponen en la tabla a continuación. Según algunas realizaciones, los polipéptidos CK tienen al menos el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 88 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencias con las secuencias de aminoácidos o de análogos de aminoácidos de las realizaciones preferidas.  
 20

Sustituciones de aminoácidos conservativas

Básicos:	arginina lisina histidina
Ácidos:	ácido glutámico ácido aspártico
Sin carga	glutamina
Polares:	asparagina serina treonina tirosina
No polares:	fenilalanina triptófano cisteína glicina alanina valina prolina metionina leucina isoleucina

25

La siguiente tabla expone otro esquema de sustitución de aminoácidos:

Residuo original	Sustituciones
Ala	Gly; Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala; Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Tyr; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

Otras variantes puede consistir en sustituciones de aminoácidos menos conservativas, tales como seleccionar residuos que se diferencian más significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) la voluminosidad de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que tengan un efecto más significativo sobre la función son aquellas en las que (a) glicina y/o prolina están sustituidas por otro aminoácido o están delecionadas o insertadas; (b) un residuo hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, está sustituido con (o por) un residuo hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (c) un residuo de cisteína está sustituido con (o por) cualquier otro residuo; (d) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histidilo, está sustituido con (o por) un residuo que tiene una carga electronegativa, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (e) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, está sustituido con (o por) uno que no tiene tal cadena lateral, por ejemplo, glicina. Otras variantes incluyen aquellas diseñadas para tanto generar sitio(s) de glicosilación y/o fosforilación novedoso(s), como aquellas diseñadas para delecionar sitio(s) de glicosilación y/o fosforilación existentes. Las variantes incluyen al menos una sustitución de aminoácidos en un sitio de glucosilación, un sitio de escisión proteolítica y/o un residuo de cisteína. Las variantes también incluyen proteínas y péptidos con residuos de aminoácidos adicionales antes o después de la secuencia de aminoácidos de proteínas o de péptidos sobre péptidos conectores. El término "variante" también engloba polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de las proteínas/péptidos de la presente invención con al menos uno y hasta 25 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20) aminoácidos adicionales que flanquean tanto el extremo 3' como 5' de la secuencia de aminoácidos o ambas.

El término "variante" también se refiere a una proteína que es al menos del 60 al 99 por ciento idéntica (por ejemplo, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99, o 100 %, ambos incluidos) en su secuencia de aminoácidos de las proteínas de la presente invención como se ha determinado por métodos convencionales que son comúnmente usados para comparar la similitud en la posición de los aminoácidos de dos polipéptidos. El grado de similitud o identidad entre dos proteínas puede calcularse fácilmente por métodos conocidos. Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias probadas. Métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas informáticos públicamente disponibles. Las variantes normalmente tendrán una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc.) sustituciones de aminoácidos, delecciones y/o inserciones en comparación con la proteína o péptido de comparación, según sea el caso.

Los compuestos incluyen compuestos que tienen una de las fórmulas generales descritas en el presente documento, además de derivados y/o miméticos de los mismos.

El término "derivado" se refiere a una proteína o polipéptido químicamente modificado que se ha modificado químicamente tanto por procesos naturales, tales como procesamiento, como otras modificaciones postraduccionales, pero también por técnicas de modificación química como, por ejemplo, mediante la adición de una o más moléculas de polietilenglicol, azúcares, fosfatos y/u otras moléculas tales, en las que la molécula o moléculas no están naturalmente unidas a proteínas naturales. Derivados incluyen sales. Tales modificaciones químicas se han descrito bien en los textos básicos y en monografías más detalladas, además de en una voluminosa bibliografía de investigación, y son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presentes en el mismo grado o grado variable en varios sitios en una proteína o polipéptido dado. Por tanto, una proteína o polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Las modificaciones pueden producirse en cualquier parte en una proteína o polipéptido, que incluye el esqueleto del péptido, las cadenas laterales del aminoácido y los extremos amino o carboxilo. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclajes de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, glicosilación, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas, tales como arginilación, y ubiquitinación. Véanse, por ejemplo, *Proteins--Structure And Molecular Properties*, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993) y Wold, F., "Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects," pág. 1-12 en *Posttranslational Covalent Modification Of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182:626-646 (1990) y Rattan et al., "Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging," *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663: 48-62 (1992). El término "derivados" incluye modificaciones químicas que hacen que la proteína o polipéptido se ramifique o sea cíclico, con o sin ramificación. Las proteínas o polipéptidos cíclicos, ramificados y circulares ramificados pueden resultar de procesos naturales postraduccionales y también pueden hacerse por métodos completamente sintéticos.

Según algunas realizaciones, los compuestos pueden incluir opcionalmente compuestos en los que el extremo N se derivatiza a un grupo  $-NRR^1$ ; a un grupo  $-NRC(O)R$ ; a un grupo  $-NRC(O)OR$ ; a un grupo  $-NRS(O)_2R$ ; a un grupo  $-NHC(O)NHR$ , en los que R y  $R^1$  son hidrógeno o alquilo inferior, con la condición de que R y  $R^1$  no sean ambos hidrógeno; a un grupo succinimida; a un grupo benciloxicarbonil-NH-(CBZ-CH-); o a un grupo benciloxicarbonil-NE que tiene de 1 a 3 sustituyentes sobre el anillo de fenilo seleccionados del grupo que consiste en alquilo inferior, alcoxi inferior, cloro y bromo.

Según algunas realizaciones, los compuestos pueden incluir opcionalmente compuestos en los que el extremo C se derivatiza a  $-C(O)R^2$  en el que  $R^2$  está seleccionado del grupo que consiste en alcoxi inferior, y  $-NR^3R^4$  en el que  $R^3$  y  $R^4$  están seleccionados independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo inferior.

El término "peptidomimético" o "mimético" se refiere a compuestos biológicamente activos que imitan la actividad biológica de un péptido o una proteína, pero ya no son de naturaleza química peptídica, es decir, ya no contienen ningún enlace peptídico (es decir, enlaces amida entre aminoácidos). Aquí, el término peptidomimético se usa en un sentido más amplio para incluir moléculas que ya no son de naturaleza completamente peptídica, tales como pseudo-péptidos, semi-péptidos y peptoides. Ejemplos de peptidomiméticos en este sentido más amplio (donde parte de un péptido está sustituido con una estructura que carece de enlaces peptídicos) se describen a continuación. Tanto completamente como parcialmente, los peptidomiméticos no peptídicos según las realizaciones proporcionan una disposición espacial de restos químicos reactivos que se parece mucho a la disposición tridimensional de grupos activos en el péptido en el que el péptido mimético se basa. Como resultado de esta geometría de sitio activo similar, el peptidomimético tiene efectos sobre sistemas biológicos que son similares a la actividad biológica del péptido.

Los péptidos y peptidomiméticos incluidos en las composiciones tienen 6 a 25, 6 a 20, 6 a 15, 6 a 10, 6 a 9, 6 a 8, 7 a 25, 7 a 20, 7 a 15, 7 a 12, 7 a 10, 7 a 9, 7 a 8, 8 a 25, 8 a 20, 8 a 15, 8 a 12, 8 a 10, 8 a 9, 9 a 25, 9 a 20, 9 a 18, 9 a 15, 9 a 14, 9 a 12, 10 a 25, 10 a 20, 10 a 15, 10 a 14, 10 a 12, 12 a 25 o 12 a 20 aminoácidos o análogos de aminoácidos de longitud.

Los peptidomiméticos de las realizaciones son preferentemente sustancialmente similares en tanto forma tridimensional como actividad biológica a los péptidos descritos en el presente documento. Según algunas realizaciones, los peptidomiméticos tienen grupos protectores en uno o ambos extremos de los compuestos de la invención, y/o sustitución de uno o más enlaces peptídicos con enlaces no peptídicos. Tales modificaciones pueden hacer los compuestos menos susceptibles a la escisión proteolítica que el propio compuesto. Por ejemplo, uno o más enlaces peptídicos pueden sustituirse con un tipo alternativo de enlace covalente (por ejemplo, un enlace carbono-carbono o un enlace acilo). Los peptidomiméticos también pueden incorporar grupos de bloqueo del extremo amino o extremo carboxilo tales como t-butiloxicarbonilo, acetilo, alquilo, succinilo, metoxisuccinilo, suberilo,

adipilo, azelaílo, dansilo, benciloxicarbonilo, fluorenilmetoxicarbonilo, metoxiazelaílo, metoxiadipilo, metoxisuberilo y 2,4,-dinitrofenilo, haciendo así el mimético menos susceptible a la proteólisis. Los enlaces no peptídicos y grupos de bloqueo de los extremos carboxilo o amino pueden usarse individualmente o en combinación para hacer el mimético menos susceptible a la proteólisis que el péptido/compuesto correspondiente. Adicionalmente, la sustitución de D-aminoácidos por el L-estereoisómero normal puede efectuarse, por ejemplo, para aumentar la semivida de la molécula.

Así, según algunas realizaciones, los compuestos pueden incluir opcionalmente un enlace pseudo-peptídico en el que uno o más de los enlaces peptídico [-C(O)NR-] han sido sustituidos con un enlace no peptídico tal como -CH<sub>2</sub>-NH-, -CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>-SO-, -CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-, -NH-CO- o -CH=CH- sustituyendo un enlace peptídico (-CO-NH-). Según algunas realizaciones, los compuestos pueden incluir opcionalmente un enlace pseudo-peptídico en el que uno o más de los enlaces peptídico [-C(O)NR-] han sido sustituidos con un enlace no peptídico tal como un enlace -CH<sub>2</sub>-carbamato [-CH<sub>2</sub>-OC(O)NR-]; un enlace fosfonato; un enlace -CH<sub>2</sub>-sulfonamida [-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>NR-]; un enlace urea [-NHC(O)NH-]; un enlace -CH<sub>2</sub>-amina secundaria; o un enlace peptídico alquilado [-C(O)NR<sup>6</sup>- en la que R<sup>6</sup> es alquilo inferior]. Los miméticos preferidos tienen de cero a todos los enlaces -C(O)NH- de la presente invención sustituidos con un pseudopéptido.

Ejemplos de métodos de modificar estructuralmente un péptido conocidos en la técnica para crear un peptidomimético incluyen la inversión de centros quirales del esqueleto que conducen a estructuras de residuos de D-aminoácidos que pueden, particularmente en el extremo N, conducir a estabilidad potenciada de la degradación proteolítica sin afectar adversamente la actividad. Un ejemplo se facilita en el documento "Tritiated D-ala1-Peptide T Binding", Smith C. S. et al., Drug Development Res., 15, pp. 371-379 (1988). Un segundo método es alterar la estructura cíclica para la estabilidad, tal como imidas y lactamas entre cadenas N a C (Ede et al. en Smith and Rivier (Eds.) "Peptides: Chemistry and Biology", Escom, Leiden (1991), pp. 268-270). Un ejemplo de esto se facilita en los compuestos similares a timopentina conformacionalmente limitados, tales como los desvelados en la patente de EE.UU. N° 4.457.489 (1985), Goldstein, G. et al. Un tercer método es sustituir enlaces peptídicos en el péptido por enlaces pseudopeptídicos que confieren resistencia a la proteólisis. La síntesis de péptidos que contienen enlaces pseudopeptídicos tales como -CH<sub>2</sub>NH-, -CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>-SO-, -CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-, NH-CO- o -CH=CH- se realiza tanto por métodos de disolución como en un procedimiento combinado con síntesis en fase sólida usando métodos convencionales de química orgánica. Así, por ejemplo, la introducción del enlace -CH<sub>2</sub>-NH- se lleva a cabo preparando en disolución el aldehído Fmoc-NH-CHR-CHO según la técnica descrita por FEHRENTZ y CASTRO (Synthesis, 676-678, 1983) y condensándolo con la cadena de péptido en crecimiento, tanto sobre una fase sólida según la técnica descrita por SASAKI y COY (Peptides, 8, 119-121, 1988) como en disolución.

#### **Composiciones/formulaciones farmacéuticas**

Las composiciones farmacéuticas para su uso en la presente invención pueden formularse por técnicas convencionales usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables. En una realización preferida de la invención, las formulaciones pueden contener un tampón y/o un conservante. Los compuestos y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para administración por cualquier vía adecuada, que incluye por inhalación, tópicamente, nasalmente, por vía oral, parenteralmente (por ejemplo, intravenosamente, intraperitonealmente, intravesicalmente o intratecalmente) o rectalmente en un vehículo que comprende uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, cuya proporción se determina por la solubilidad y naturaleza química del péptido, vía de administración elegida y práctica biológica estándar.

Según algunas realizaciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades eficaces de uno o más compuestos junto con, por ejemplo, diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/u otros vehículos farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones incluyen diluyentes de diverso contenido de tampón (por ejemplo, TRIS u otras aminas, carbonatos, fosfatos, aminoácidos, por ejemplo, clorhidrato de glicinamida (especialmente en el intervalo de pH fisiológico), N-glicilglicina, fosfato de sodio o potasio (dibásico, tribásico), etc. o TRIS-HCl o acetato), pH y fuerza iónica; aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, tensioactivos tales como Pluronic, Tween 20, Tween 80 (Polysorbate 80), Cremophor, polioles tales como polietilenglicol, propilenglicol, etc.), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, Thimersol, alcohol bencilico, parabenos, etc.) y sustancias de carga (por ejemplo, azúcares tales como sacarosa, lactosa, manitol, polímeros tales como polivinilpirrolidonas o dextrano, etc.); y/o incorporación del material en preparaciones en partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc. o en liposomas. También puede usarse ácido hialurónico. Tales composiciones pueden emplearse para influir en el estado físico, estabilidad, tasa de liberación *in vivo* y tasa de eliminación *in vivo* de un compuesto de la presente invención. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042) páginas 1435-1712. Las composiciones pueden, por ejemplo, prepararse en forma líquida, o puede estar en polvo seco, tales como forma liofilizada. Métodos particulares de administración de tales composiciones se describen más adelante.

Si un tampón va a incluirse en las formulaciones, el tampón está seleccionado del grupo que consiste en acetato sódico, carbonato sódico, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, fosfato de sodio y tris(hidroximetil)-aminometano, o mezclas de los mismos. En una realización preferida, el tampón es glicilglicina, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, fosfato de

sodio o mezclas de los mismos.

Si un conservante farmacéuticamente aceptable va a incluirse en las formulaciones, el conservante está seleccionado del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y tiomerosal, o mezclas de los mismos. En una realización preferida, el conservante es fenol o m-cresol.

5

En otra realización, el conservante está presente en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, más preferentemente en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, y lo más preferentemente en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml.

10 El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es muy conocido para el experto. Por comodidad se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En otra realización, la formulación puede comprender además un agente quelante en el que el agente quelante puede seleccionarse de sales de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y mezclas de los mismos.

15 En otra realización, el agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En otra realización, el agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml. En otra realización, el agente quelante está presente en una concentración de 2 mg/ml a 5 mg/ml.

El uso de un agente quelante en las composiciones farmacéuticas es muy conocido para el experto. Por comodidad se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

20 En otra realización, la formulación puede comprender además un estabilizador seleccionado del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular en los que tales estabilizadores incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (por ejemplo PEG 3350), poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, diferentes sales (por ejemplo, cloruro sódico), L-glicina, L-histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas de los mismos. En una realización preferida, el estabilizador está seleccionado del grupo que consiste en L-histidina, imidazol y arginina.

25

En otra realización, el polímero de alto peso molecular está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 50 mg/ml. En otra realización de la invención, el polímero de alto peso molecular está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En otra realización, el polímero de alto peso molecular está presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En otra realización, el polímero de alto peso molecular está presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. En otra realización, el polímero de alto peso molecular está presente en una concentración de 20 mg/ml a 30 mg/ml. En otra realización, el polímero de alto peso molecular está presente en una concentración de 30 mg/ml a 50 mg/ml.

30

En otra realización, el compuesto de bajo peso molecular está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 50 mg/ml. En otra realización, el compuesto de bajo peso molecular está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En otra realización, el compuesto de bajo peso molecular está presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En otra realización, el compuesto de bajo peso molecular está presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. En otra realización, el compuesto de bajo peso molecular está presente en una concentración de 20 mg/ml a 30 mg/ml. En otra realización, el compuesto de bajo peso molecular está presente en una concentración de 30 mg/ml a 50 mg/ml.

35

40 El uso de un estabilizador en composiciones farmacéuticas es muy conocido para el experto. Por comodidad se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En otra realización, la formulación puede comprender además un tensioactivo en el que un tensioactivo puede seleccionarse de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolisados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácidos grasos de sorbitano, poloxámeros, tales como 188 y 407, ésteres de ácidos grasos de sorbitano con polioxietileno, derivados de polioxietileno tales como derivados alquilados y alcoxlados (tweens, por ejemplo, Tween-20, o Tween-80), monoglicéridos o derivados etoxilados de los mismos, diglicéridos o derivados de polioxietileno de los mismos, glicerol, ácido cólico o derivados del mismo, lecitinas, alcoholes y fosfolípidos, glicerofosfolípidos (lecitinas, cefalinas, fosfatidilserina), gliceroglicolípidos (galactopiranosido), esfingofosfolípidos (esfingomielina) y esfingoglicolípidos (ceramidas, gangliósidos), DSS (docusato sódico, docusato cálcico, docusato potásico), SDS (dodecilsulfato de sodio o laurilsulfato de sodio), ácido dipalmitoilfosfatídico, caprilato de sodio, ácidos biliares y sales de los mismos y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, desocolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos monovalentes aniónicos (alquil-aril-sulfonatos), palmitoil lisofosfatidil-L-serina, lisofosfolípidos (por ejemplo, ésteres de 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina), derivados de alquilo, alcoxilo (éster de alquilo), alcoxi (alquil éter) de lisofosfatidilo y fosfatidilcolinas, por ejemplo, derivados de lauroilo y miristoilo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, que es colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y las DODAC,

50

55



DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina positivamente cargadas, tensioactivos de ión bipolar (por ejemplo N-alkil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, dodecilfosfocolina, miristoilfosfatidilcolina, lisolectina de huevo de gallina), tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternario) (por ejemplo, bromuro de cetiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos, copolímeros de bloque de poli(óxido de etileno)/poli(óxido de propileno) (Pluronic/Tetronic, Triton X-100,  $\beta$ -D-glucopiranosido de dodecilo) o tensioactivos poliméricos (Tween-40, Tween-80, Brij-35), derivados de ácido fusídico (por ejemplo, tauro-dihidrofusidato de sodio, etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales de los mismos, C6-C12 (por ejemplo ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados N $\alpha$ -acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de cadena lateral de lisina o arginina, derivados N $\alpha$ -acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado N $\alpha$ -acilado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, o el tensioactivo puede seleccionarse del grupo de derivados de imidazolina, o mezclas de los mismos.

El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas es muy conocido para el experto. Por comodidad se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>a</sup> edición, 1995.

Edulcorantes farmacéuticamente aceptables comprenden preferentemente al menos un edulcorante intenso tal como sacarina, sacarina sódica o cálcica, aspartamo, acesulfame potásico, ciclamato sódico, alitame, un edulcorante de dihidrochalcona, monellina, esteviósido o sucralosa (4,1',6'-triclora-4,1',6'-tridesoxigalactosacarosa), preferentemente sacarina, sacarina sódica o cálcica, y opcionalmente un edulcorante a granel tal como sorbitol, manitol, fructosa, sacarosa, maltosa, isomalt, glucosa, jarabe de glucosa hidrogenado, xilitol, caramelo o miel.

Los edulcorantes intensos se emplean convenientemente en bajas concentraciones. Por ejemplo, en el caso de sacarina sódica, la concentración puede oscilar del 0,04 % al 0,1 % (peso/volumen) basado en el volumen total de la formulación final, y preferentemente es aproximadamente el 0,06 % en las formulaciones de baja dosificación y aproximadamente el 0,08 % en las de alta dosificación. El edulcorante a granel puede usarse eficazmente en mayores cantidades que oscilan de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 35 %, preferentemente de aproximadamente el 10 % al 15 % (peso/volumen).

Las formulaciones pueden prepararse por técnicas convencionales, por ejemplo, como se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985 o en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>a</sup> edición, 1995, en los que tales técnicas convencionales de la industria farmacéutica implican disolver y mezclar los componentes según convenga para dar el producto final deseado.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" o "terapéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y preferentemente normalmente no producen una reacción no deseada alérgica o similar, tal como molestias estomacales, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano. Preferentemente, como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea generalmente reconocida (por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)) para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

En algunas realizaciones, los péptidos o composiciones farmacéuticas de la presente invención van a administrarse mediante inyección intravenosa.

Para administración por vía oral, el péptido o una sal terapéuticamente aceptable del mismo puede formularse en formas de dosificación unitaria tales como cápsulas o comprimidos. Los comprimidos o cápsulas pueden prepararse mediante medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, que incluyen aglutinantes, por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa; cargas, por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio; lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice; disgregantes, por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón; o agentes humectantes, por ejemplo, laurilsulfato de sodio. Los comprimidos pueden recubrirse por métodos muy conocidos en la técnica. Preparaciones líquidas para administración por vía oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, agentes de suspensión, por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa, o grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes, por ejemplo, lecitina o goma arábiga; vehículos no acuosos, por ejemplo, aceite de almendra, ésteres aceitosos, alcohol etílico, o aceites vegetales fraccionados; y conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo, o ácido sórbico. Las preparaciones también pueden contener sales de tampón, aromatizantes, colorantes y/o edulcorantes según convenga. Si se desea, las preparaciones para administración por vía oral pueden estar adecuadamente formuladas para dar la liberación controlada del compuesto activo.

Para administración tópica, el péptido puede formularse en un vehículo farmacéuticamente aceptable que contiene del 0,1 al 10 por ciento, preferentemente del 0,5 al 5 por ciento, del (de los) compuesto(s) activo(s). Tales formulaciones pueden estar en forma de una crema, loción, comprimido sublingual, aerosoles y/o emulsiones y

pueden incluirse en un parche transdérmico o bucal de la matriz o tipo de depósito como son convencionales en la materia para este fin.

Para administración parenteral, los compuestos se administran por tanto inyección intravenosa, subcutánea como intramuscular, en composiciones con vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los compuestos pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multi-dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, por ejemplo, agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril, antes de uso.

Para administración mediante inyección, se prefiere usar el (los) compuesto(s) en disolución en un vehículo acuoso estéril que también puede contener otros solutos tales como tampones o conservantes, además de cantidades suficientes de sales farmacéuticamente aceptables o de glucosa para hacer la disolución isotónica. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse con un vehículo farmacéuticamente aceptable para proporcionar disoluciones o suspensiones estériles para administración inyectable. En particular, los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, tanto como disoluciones líquidas como suspensiones, formas sólidas adecuadas para disolución o suspensiones en líquido antes de inyección o como emulsiones. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, manitol, lactosa, lecitina, albúmina, glutamato de sodio, clorhidrato de cisteína o similares. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes de tamponamiento del pH y similares. Si se desea, pueden utilizarse preparaciones que mejoran la absorción (por ejemplo, liposomas). Vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin.

Para administración por inhalación, los compuestos pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación de spray en aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor apropiado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono, u otro gas adecuados. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, por ejemplo, lactosa o almidón. Para administración intranasal, los compuestos pueden usarse, por ejemplo, como un spray líquido, como un polvo o en forma de gotas.

Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales, por ejemplo, supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales, por ejemplo, manteca de cacao u otros glicéridos.

Además, los compuestos pueden formularse como una preparación de liberación retardada. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

Las composiciones pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El envase puede, por ejemplo, comprender lámina metálica o de plástico, por ejemplo, un envase alveolado. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para administración.

#### **Dosificaciones**

Los compuestos pueden administrarse a un paciente a dosis terapéuticamente eficaces para prevenir, tratar o controlar enfermedades y trastornos mediados, por completo o en parte, por una interacción GPCR-ligando. Las composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de compuestos pueden administrarse a un paciente en una cantidad suficiente para provocar una respuesta protectora o terapéutica eficaz en el paciente. Una cantidad adecuada para realizar esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz". La dosis se determinará por la eficacia del compuesto particular empleado y la afección del sujeto, además del peso corporal o área superficial del área que va a tratarse. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto adverso que acompañe a la administración de un compuesto particular o vector en un sujeto particular.

La toxicidad y eficacia terapéutica de tales compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación, DL50/DE50. Se prefieren compuestos que presentan grandes índices terapéuticos. Aunque pueden usarse

compuestos que presentan efectos secundarios tóxicos, deberá tenerse cuidado en el diseño de un sistema de administración que dirija tales compuestos al sitio de tejido afectado para minimizar el posible daño a células normales y, así, reducir los efectos secundarios.

5 Pueden usarse los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración. Para cualquier compuesto usado en los métodos de la presente divulgación, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede  
10 formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluye la CI50 (la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición al 50 % de los síntomas) como se determina en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En general, el equivalente de dosis de un modulador es de aproximadamente 1 ng/kg a 10 mg/kg para un sujeto típico.

15 La cantidad y frecuencia de administración de los compuestos y/o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos se regulará según el criterio del profesional clínico que atiende considerando factores tales como la edad, afección y tamaño del paciente, además de la gravedad de los síntomas que están tratándose. Un médico o veterinario generalmente experto puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz del fármaco requerida para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección. En general se contempla que una cantidad eficaz  
20 sería de 0,001 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal, y en particular de 0,01 mg/kg a 1 mg/kg de peso corporal. Más específicamente se contempla que una cantidad eficaz sería para infundir continuamente por administración intravenosa de 0,01 microgramos/kg de peso corporal/min a 100 microgramos/kg de peso corporal/min durante un periodo de 12 horas a 14 días. Puede ser apropiado administrar las dosis requeridas como dos, tres, cuatro o más sub-dosis a intervalos apropiados durante todo el día. Dichas sub-dosis pueden formularse como formas de dosificación unitaria, por ejemplo, que contienen 0,01 a 500 mg, y en particular 0,1 mg a 200 mg de principio activo  
25 por forma de dosificación unitaria.

Preferentemente, la preparación farmacéutica está en una forma de dosificación unitaria. En tal forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias de tamaño adecuado que contienen cantidades apropiadas del componente activo, por ejemplo, una cantidad eficaz para lograr el fin deseado. La cantidad de compuesto activo en una dosis unitaria de preparación puede variarse o ajustarse de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente  
30 1000 mg, preferentemente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 750 mg, más preferentemente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg, y lo más preferentemente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 250 mg, según la aplicación particular. La dosificación actual empleada puede variarse dependiendo de los requisitos del paciente y la gravedad de la afección que está tratándose. La determinación de la pauta de dosificación adecuada para una situación particular está dentro de la experiencia de la materia. Por  
35 comodidad, la dosificación total puede dividirse y administrarse en porciones durante el día según se requiera.

#### **Uso médico**

En algunas realizaciones, los péptidos y composiciones farmacéuticas de la presente invención son para su uso en el tratamiento de trastornos cardiovasculares. En otras realizaciones, la invención proporciona el uso de un péptido o  
40 composición farmacéutica de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastorno cardiovascular. Estos trastornos incluyen insuficiencia cardíaca descompensada, hipertensión crónica, crisis hipertensiva, insuficiencia cardíaca aguda congestiva, angina, infarto agudo de miocardio, insuficiencia ventricular izquierda, insuficiencia cerebrovascular, hemorragia intracraneal, hipertensión esencial, hipertensión posoperatoria, enfermedad cardíaca hipertensiva, enfermedad renal hipertensiva, hipertensión renovascular, hipertensión maligna,  
45 estabilización del paciente tras trasplante renal, cardiomiopatía dilatada, miocarditis, estabilización del paciente tras trasplante cardíaco, trastornos asociados a tratamiento posterior a prótesis endovascular, hipertensión neurogénica, preeclampsia, aneurisma de la aorta abdominal. En realizaciones específicas, el trastorno cardiovascular es insuficiencia cardíaca. En realizaciones más específicas, la insuficiencia cardíaca es insuficiencia cardíaca aguda. Ejemplos de trastornos cardiovasculares agudos incluyen, pero no se limitan a, crisis hipertensiva, toxemia del  
50 embarazo e insuficiencia cardíaca aguda congestiva.

#### **Terapias de combinación**

La presente divulgación también proporciona un método de tratamiento de cualquier trastorno cardiovascular o cardiorrenal administrando una o más de las composiciones de la invención como se han descrito anteriormente en combinación con otros fármacos para el tratamiento de trastornos cardiovasculares y/o cardiorrenales. Estos otros  
55 fármacos incluyen diuréticos tales como furosemida; vasodilatadores tales como nitroglicerina, nitroprusiato, péptido natriurético cerebral (BNP) o análogos de los mismos; inótropos tales como dobutamina; inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) tales como captopril y enalapril;  $\beta$ -bloqueantes tales como carvedilol y propranolol; bloqueantes de los receptores de angiotensina (ARB) tales como valsartan y candesartan; y/o antagonistas de aldosterona tales como espironolactona.

En las terapias de combinación, una o más composiciones se coadministran con uno o más fármacos para el tratamiento de trastornos cardiovasculares y/o cardiorrenales para aumentar la eficacia del tratamiento de trastornos cardiovasculares y/o cardiorrenales y para reducir los efectos secundarios asociados a la alta dosis de estos terapéuticos.

- 5 Las terapias de combinación descritas anteriormente tienen efectos terapéuticos sinérgicos y aditivos. La sinergia se define como la interacción de dos o más agentes de manera que su efecto combinado sea mayor que la suma de sus efectos individuales. Por ejemplo, si el efecto del fármaco A solo en el tratamiento de una enfermedad es del 25 % y el efecto del fármaco B solo en el tratamiento de una enfermedad es del 25 %, pero cuando los dos fármacos se combinan el efecto en el tratamiento de la enfermedad es del 75 %, el efecto de A y B es sinérgico.
- 10 Aditividad se define como la interacción de dos o más agentes de manera que su efecto combinado sea el mismo que la suma de sus efectos individuales. Por ejemplo, si el efecto del fármaco A solo en el tratamiento de una enfermedad es del 25 % y el efecto del fármaco B solo en el tratamiento de una enfermedad es del 25 %, pero cuando los dos fármacos se combinan el efecto en el tratamiento de la enfermedad es del 50 %, el efecto de A y B es aditivo.
- 15 Una mejora en la pauta terapéutica del fármaco puede describirse como la interacción de dos o más agentes de manera que su efecto combinado reduzca la incidencia de acontecimiento adverso (AE) de cualquiera o ambos de los agentes usados en co-terapia. Esta reducción en la incidencia de efectos adversos puede ser un resultado de, por ejemplo, administración de menores dosificaciones de cualquiera o ambos de los agentes usados en la co-terapia. Por ejemplo, si el efecto del fármaco A solo es del 25 % y tiene una incidencia de acontecimientos adversos del 45 % a la dosis marcada; y el efecto del fármaco B solo es del 25 % y tiene una incidencia de acontecimientos adversos del 30 % a la dosis marcada, pero cuando los dos fármacos se combinan a dosis menores de las marcadas de cada uno, si el efecto global es del 35 % (una mejora, pero no sinérgica ni aditivo) y la tasa de incidencia adversa es del 20 %, hay una mejora en la pauta terapéutica del fármaco.
- 20

### Ejemplos

#### 25 **Ejemplo 1: Síntesis de compuestos**

Se prepararon péptidos y productos intermedios descritos en el presente documento por el método de síntesis de péptidos en fase sólida (véase R. Merrifield J. Am. Chem. Soc. 1964, 85, 2149; M. Bodansky, "Principles of Peptide Synthesis". Springer-Verlag, 1984). La síntesis de péptidos y procedimientos de purificación empleados fueron métodos convencionales bien descritos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, procedimientos de acoplamiento de aminoácidos, etapas de lavado, procedimientos de desprotección, procedimientos de escisión de resina y métodos de purificación por intercambio iónico y por HPLC usando sintetizadores de péptidos automatizados comerciales y resinas y aminoácidos protegidos comercialmente disponibles. Más específicamente, los péptidos se sintetizaron a partir de su extremo C por adición escalonada de aminoácidos protegidos con Fmoc (pre-activados o activados *in situ*) y desprotección del grupo Fmoc con piperidina dando un conector lábil de ácido unido a una resina de soporte insoluble. Tras la síntesis, el péptido unido a la resina se desprotegió de la cadena lateral y se desprendió de la resina con ácido trifluoroacético y secuestrantes de cationes. Los péptidos se purificaron por extracción acuosa o mediante precipitación en disolventes orgánicos tales como éter o t-butil metil éter, seguido por centrifugación y decantación y/o por HPLC y liofilización.

30

35

#### **Ejemplo 2: Ensayo de reclutamiento de B-arrestina**

40 El acontecimiento proximal en la función de  $\beta$ -arrestina mediada por GPCR es el reclutamiento para receptores tras la unión del ligando y la fosforilación del receptor por GRK. Así, se usó la medida del reclutamiento de  $\beta$ -arrestina para determinar la eficacia del ligando para la función de  $\beta$ -arrestina.

El reclutamiento de B-arrestina-2 para el receptor humano y de rata de tipo 1 de la angiotensina 2 (AT1R humano y AT1aR de rata, respectivamente) se midió con el ensayo de  $\beta$ -arrestina PathHunter™ (DiscoveRx Corporation, Fremont CA). Se compraron células, plásmido(s) y reactivo(s) de detección de DiscoveRx y se realizaron ensayos por instrucciones del fabricante. Se clonaron AT1R humano y AT1aR de rata en el vector pCMV-ProLink, se verificó por secuenciación y se transfectaron en células HEK293 de  $\beta$ -arrestina PathHunter. Se seleccionaron líneas celulares clonales establemente transfectadas con higromicina y G418. Estas líneas celulares clonales se usaron para todos los experimentos.

45

50 Para los ensayos, se sembraron 25.000 células por pocillo en microplacas de 96 pocillos en volúmenes de 90  $\mu$ l y se dejó que crecieran durante la noche a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>. Los péptidos de la invención se disolvieron en agua desionizada a una concentración de 1 mM. Entonces, los péptidos se diluyeron adicionalmente en tampón de ensayo (solución salina equilibrada de Hank con HEPES 20 mM) para añadir péptido a las células para alcanzar concentraciones finales que oscilaban de 10  $\mu$ M a 1 pM. Entonces, las células se incubaron durante 60 minutos a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>, seguido por la adición de 50  $\mu$ l de reactivo de detección PathHunter a cada pocillo. A continuación, las microplacas se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos, y a continuación se midió la luminiscencia usando un lector de microplacas NOVostar comprado de BMG Labtech. El reclutamiento de B-arrestina-2 para receptores se midió como intensidad relativa de luminiscencia expresada en unidades arbitrarias.

55

Los resultados se muestran en la Tabla 2 más adelante.

**Ejemplo 3: Ensayo de acumulación de IP1**

También se realizó una medida secundaria de la eficacia de acoplamiento de proteína G. IP3 se genera por activación de fosfolipasa C por G $\alpha$ -q. IP3 se degrada a IP1, que puede ser forzado a acumularse en células bloqueando la degradación con cloruro de litio. Así, los presentes inventores midieron la acumulación de IP1 para determinar la eficacia del ligando para la activación de proteína G.

La acumulación de IP1 generada por el receptor humano y de rata de tipo 1 de la angiotensina 2 (AT1R humano y AT1aR de rata, respectivamente) se midió con kits IP-One Tb comprados de Cisbio y se usó por las instrucciones del fabricante. Se usaron líneas celulares clonales establemente transfectadas que expresan AT1R humano o AT1aR de rata para todos los experimentos.

Para los ensayos, se sembraron 4.000 células por pocillo en microplacas de pequeño volumen de 384 pocillos en volúmenes de 20  $\mu$ l y se dejó que crecieran durante la noche a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>. A continuación se sustituyeron los medios de crecimiento celular con tampón de estimulación suministrado por Cisbio que contenía cloruro de litio 50 mM. Los péptidos TRV-120.001 a TRV-120.035 se disolvieron en agua desionizada a una concentración de 1 mM. Para la detección de agonista, los péptidos se diluyeron entonces adicionalmente en tampón de estimulación para añadir péptido a las células para alcanzar concentraciones finales que oscilaron de 10  $\mu$ M a 1 pM. Para la detección de antagonista, los péptidos se diluyeron entonces adicionalmente en tampón de estimulación para añadir péptido a las células para alcanzar concentraciones finales que oscilaron de 10  $\mu$ M a 1 pM, y seguido por la adición de AngII 10 nM. Tras la adición de péptidos, las células se incubaron a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> durante 30 minutos y luego se lisaron con reactivos de detección añadidos por las instrucciones del fabricante. Las microplacas se incubaron durante 60-90 minutos y a continuación se midieron las intensidades de fluorescencia resuelta en el tiempo usando un lector de microplacas PHERAstar Plus de BMG Labtech. La acumulación de IP1 se midió como el cambio en la relación de intensidades fluorescentes resueltas en el tiempo medidas a 665 nm y 620 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación.

**Tabla 2: Actividad biológica**

Nº	AT1R humano				AT1aR de rata			
	b-arrestina-2		IP One		b-arrestina-2		IP One	
	CE50 (M)	Max (%)	CE50 (M)	Max (%)	CE50 (M)	Max (%)	CE50 (M)	Max (%)
AngII	9,7E-09	99,0	2,6E-09	96,9	6,8E-09	97,0	1,3E-09	98,1
Valsartan	inactiva		inactiva		inactiva			
2	4,5E-06	24,9	inactiva		inactiva		3,6E-07	33,8
3	4,5E-07	36,5	inactiva		1,2E-07	67,1	4,1E-08	19,6
5	1,6E-06	39,4	6,5E-08	18,1	1,9E-06	61,7	9,6E-08	24,8
6	9,2E-07	12,1	1,1E-07	14,1	inactiva		5,9E-08	21,9
7	1,1E-08	63,0	inactiva		7,5E-09	86,5	6,0E-09	9,3
8	2,1E-07	36,9	inactiva		2,0E-07	41,8	3,5E-08	11,3
9	9,2E-09	69,2	inactiva		4,8E-09	74,0	6,6E-09	9,5
10	1,6E-07	55,2	inactiva		1,8E-07	60,3	2,2E-07	13,3
11	3,4E-09	58,9	inactiva		6,1E-09	80,7	3,5E-09	24,4
12	3,9E-07	19,9	1,9E-07	20,7	1,2E-07	34,4	7,9E-08	44,9
13	4,6E-06	43,4	inactiva		4,3E-05	165,3	Inactiva	
14	8,0E-09	59,3	1,6E-07	13,5	1,4E-08	79,0	3,2E-08	19,3
15	8,2E-07	44,3	2,5E-07	19,3	2,3E-07	62,1	7,7E-08	51,1
16	8,8E-07	56,9	inactiva		1,4E-07	76,9	9,2E-08	24,4
19	3,1E-08	67,9	inactiva		1,8E-08	91,2	Inactiva	
20	inactiva		inactiva		3,6E-06	86,6	Inactiva	
21	3,3E-08	64,4	inactiva		1,3E-08	82,7	Inactiva	

ES 2 558 629 T3

Nº	AT1R humano				AT1aR de rata			
	b-arrestina-2		IP One		b-arrestina-2		IP One	
	CE50 (M)	Max (%)	CE50 (M)	Max (%)	CE50 (M)	Max (%)	CE50 (M)	Max (%)
22	2,7E-07	54,5	inactiva		2,7E-08	74,3	2,5E-07	5,2
23	4,4E-08	61,2	inactiva		3,9E-08	84,9	1,1E-08	10,3
24	4,8E-07	61,3	inactiva		6,3E-08	74,1	7,4E-09	15,1
25	2,1E-08	57,9	inactiva		1,5E-08	77,0	7,3E-09	14,1
26	7,5E-08	51,9	inactiva		3,8E-08	77,3	Inactiva	
27	1,7E-08	58,1	inactiva		1,6E-08	84,2	Inactiva	
28	2,0E-08	82,9	inactiva		1,9E-08	91,4	6,4E-08	24,6
29	5,9E-07	43,3	inactiva		2,0E-07	64,8	Inactiva	
30	9,2E-09	68,2	inactiva		8,2E-09	80,4	Inactiva	
31	1,0E-07	58,1	inactiva		3,7E-08	75,9	1,3E-08	6,2
32	7,9E-08	55,6	inactiva		4,3E-08	80,2	2,4E-08	6,8
33	4,0E-08	54,9	inactiva		3,1E-08	86,9	Inactiva	
34	2,5E-08	53,0	inactiva		3,2E-08	81,7	Inactiva	
35	1,2E-08	67,9	2,7E-09	7,1	9,3E-09	79,8	1,2E-08	30,5
36	1,2E-06	39,5	inactiva		1,9E-06	32,8	1,0E-07	19,2
37	1,7E-06	62,3	inactiva		1,9E-06	60,7	2,4E-07	14,7
38	6,8E-07	43,1	inactiva		2,5E-06	66,4	9,2E-07	20,8
44	8,0E-08	47,3	inactiva		6,5E-08	71,9	8,2E-09	14,6
57	4,3E-07	42,06	3,6E-09	10,03	4,5E-07	64,38	3,3E-07	35,26
58	3,3E-07	48,67	inactiva		2,6E-07	81,1	1,4E-06	9,937
59	1,4E-06	19,49	inactiva		8,2E-07	27,84	Inactiva	
60	3,4E-07	44,02	inactiva		1,8E-07	79,27	Inactiva	
61	1,2E-06	37,55	inactiva		2,1E-06	60,39	Inactiva	
62	1,3E-06	24,68	inactiva		3,9E-06	44,19	Inactiva	
63	5,3E-07	35,93	inactiva		5,3E-07	50,13	Inactiva	
64	1,2E-06	20,39	inactiva		8,7E-07	26,95	Inactiva	
65	2,0E-06	37,8	inactiva		2,8E-06	67,27	Inactiva	
66	6,7E-06	30,56	inactiva		1,0E-05	58,54	Inactiva	
67	1,0E-07	100,6	inactiva		6,3E-08	117	Inactiva	
68	6,3E-07	39,2	inactiva		4,0E-07	59,2	2,5E-05	21,2
69	1,3E-08	53,9	inactiva		1,0E-08	88,3	Inactiva	
70	1,6E-07	29,1	inactiva		7,9E-08	55,6	Inactiva	
71	4,0E-07	52,7	inactiva		1,6E-07	81,7	Inactiva	
72	6,3E-08	62,6	inactiva		2,5E-08	88,6	Inactiva	
73	5,0E-06	46,8	inactiva		4,0E-06	77,4	2,5E-06	20,8
74	2,5E-07	47,8	inactiva		1,0E-07	59,0	Inactiva	
75	2,5E-08	55,0	inactiva		1,3E-08	79,3	2,5E-05	26,7

Nº	AT1R humano				AT1aR de rata			
	b-arrestina-2		IP One		b-arrestina-2		IP One	
	CE50 (M)	Max (%)	CE50 (M)	Max (%)	CE50 (M)	Max (%)	CE50 (M)	Max (%)
76	1,6E-06	43,0	inactiva		6,3E-07	55,5	Inactiva	
77	5,0E-08	97,5	inactiva		4,0E-08	110,5	Inactiva	
78	1,0E-08	71,5	inactiva		5,0E-09	91,3	Inactiva	
79	7,9E-09	64,8	inactiva		7,9E-09	93,6	Inactiva	
80	1,0E-06	58,5	inactiva		5,0E-07	82,9	Inactiva	
81	1,0E-05	32,6	inactiva		1,0E-05	54,3	Inactiva	
82	312E-07	38,3	inactiva		1,3E-07	60,6	Inactiva	
83	2,0E-07	34,3	inactiva		5,0E-08	70,2	Inactiva	
84	3,2E-08	50,5	inactiva		1,6E-08	80,6	Inactiva	
85	1,6E-06	51,1			5,0E-07	75,5	1,6E-05	23,4

Nota: inactiva significa que CE50 fue superior a 10 uM.

#### **Ejemplo 4: Ensayo de movilización de calcio**

Puede medirse la eficacia de la proteína G de muchas formas. Los GPCR que se acoplan a la subclase Gq de proteínas G heterotrimeras activan una amplia matriz de transducción de señales cuando se activan por agonistas. Una de las vías más comúnmente medidas es la activación de fosfolipasa C por Galfa-q, que escinde fosfatidilinositol bisfosfato para liberar IP<sub>3</sub>; IP<sub>3</sub> libera a su vez calcio al citosol de las reservas intracelulares mediante el receptor de IP<sub>3</sub>. Así, los presentes inventores midieron calcio libre intracelular para determinar la eficacia del ligando para la activación de proteína G.

El calcio libre intracelular generado por el receptor humano y de rata de tipo 1 de la angiotensina 2 (AT1R humano y AT1aR de rata, respectivamente) se midió con kits Fluor-4 NW comprados de Invitrogen y se usaron por las instrucciones del fabricante. Se usaron líneas celulares clonales establemente transfectadas que expresaban AT1R humano o AT1aR de rata para todos los experimentos.

Para los ensayos, se sembraron 25.000 células por pocillo en microplacas de 96 pocillos en volúmenes de 90 ul y se dejó que crecieran durante la noche a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>. Se mezcló colorante Fluor-4 NW con probenecid y tampón de ensayo (solución salina equilibrada de Hank con HEPES 20 mM), y el medio de crecimiento celular se sustituyó con esta mezcla, seguido de incubación durante 30-45 minutos a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>. Los péptidos TRV-120.001 a TRV-120.035 se disolvieron en agua desionizada a una concentración de 1 mM. A continuación, los péptidos se diluyeron adicionalmente en tampón de ensayo (solución salina equilibrada de Hank con HEPES 20 mM) para añadir péptido a las células para alcanzar concentraciones finales que oscilaron de 10 uM a 1 pM. El péptido se añadió a las células mientras que la intensidad de fluorescencia se midió usando un lector de microplacas NOVostar comprado de BMG Labtech. La movilización de calcio se midió como intensidad relativa de fluorescencia expresada como veces por encima del nivel inicial a 5 segundos y 20 segundos después de la adición de ligando.

#### **Ejemplo 5: Evaluación de SEC ID N°: 27 en ratas normales**

Se probaron los efectos de SEC ID N°: 27 sobre la función vascular y cardíaca por infusión i.v. a dosis que oscilaban de 0,1 - 10 µg/kg/min en experimentos de dosificación preliminares en ratas anestesiadas normales. Se hicieron diversas mediciones hemodinámicas que incluyeron tensión arterial media, frecuencia cardíaca y relaciones de presión-volumen. SEC ID N°: 27 produjo una disminución dependiente de la dosis en la tensión arterial media con de poco a ningún efecto sobre HR. Además, SEC ID N°: 27 aumentó la pendiente de la relación de la presión-volumen sistólico final y preservó el trabajo de latidos pre-reclutable, produciendo la preservación del volumen sistólico en segundo plano de una disminución en la vasoconstricción.

#### **Ejemplo 6: Evaluación de SEC ID N°: 27 en un modelo de perro de ritmo marcado de insuficiencia cardíaca aguda**

También se dosificó SEC ID N°: 27 (aumento de dosis de 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 mcg/kg/min, 30 minutos cada dosis) en el modelo de insuficiencia cardíaca con ritmo marcado. En el modelo de perro con ritmo marcado, los marcapasos se implantan y se marca el ritmo de los corazones de perros durante diez días a una tasa de 240 latidos por minuto, produciendo función sistólica ventricular izquierda reducida, congestión del lado derecho y una elevación en la actividad del sistema renina-angiotensina. En los perros con insuficiencia cardíaca, SEC ID N°: 27 produjo una disminución dependiente de la dosis en la tensión arterial media, resistencia vascular sistémica, presión de

enclavamiento capilar pulmonar y tensión arterial derecha, y el gasto cardíaco se preservó en estos animales. Al nivel del riñón, hubo un aumento dependiente de la dosis en la circulación sanguínea renal, produciendo una disminución significativa en la resistencia vascular renal. La eliminación de sodio en la orina aumentó moderadamente con la diuresis, manteniéndose el potasio en la orina y la tasa de filtración glomerular.



LISTA DE SECUENCIAS

<110> YAMASHITA, DENNIS  
 CHEN, XIAO-TAO

5 <120> Efectores de beta-arrestina y composiciones y métodos de uso de los mismos  
 <130> 37654-501001US

<140> 12/647,810  
 <141> 28-12-2009

10 <150> 61/141,126  
 <151>29-12- 2008

<160> 89

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

25 <400> 1  
**Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe**  
 1 5

<210> 2  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

40 <220>  
 <223> Amidado en el extremo C

45 <400> 2  
**Xaa Arg Val Ile Ile His Pro Ile**  
 1 5

<210> 3  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

60

<400> 3  
**Xaa Arg Val Ile Val His Pro Ile**  
 1 5

5 <210> 4  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina, N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina, N,N-dimetil-glicina, ácido L-aspartico, ácido D-aspartico, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico, N-metil-ácido L-aspartico, N-metil-ácido L-glutámico, ácido pirrolid-1-il acético o ácido morfolin-4-il acético

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> L-isoleucina, glicina, L-tirosina, O-metil-L-tirosina, L-valina, L-fenilalanina, 3-hidroxi-L-tirosina, 2,6-dimetil-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 4-fluorofenil-L-analina, 2,6-difluoro-L-tirosina, 3-nitro-L-tirosina, 3,5-dinitro-L-tirosina, 3,5-dibromo -L-tirosina, 3-cloro-L-tirosina, O-alil-L-tirosina o 3,5-diyodo-L-tirosina

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> L-isoleucina, L-valina, L-tirosina, ácido L-glutámico, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-arginina, O-metil-L-treonina, D-alanina o L-norvalina

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> L-isoleucina, L-isoleucina-amida, glicina, glicina-amida, L-alanina, L-alanina-amida, D-alanina, D-fenilalanina o L-Norvalina

35 <220>  
 <223> Véase la memoria presentada para una descripción detallada de las sustituciones y de las realizaciones preferidas

40 <400> 4  
**Xaa Arg Val Xaa Xaa His Pro Xaa**  
 1 5

45 <210> 5  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

60 <400> 5  
**Xaa Arg Val Gly Val His Pro Gly**  
 1 5

<210> 6  
 <211> 8

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 10 <223> Sarcosina  
  
 <220>  
 <223> Amidado en el extremo C  
  
 15 <400> 6  
 Xaa Arg Val Gly Val His Pro Gly  
 1 5  
  
 <210> 7  
 <211> 8  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 25  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina  
 30  
 <400> 7  
 Xaa Arg Val Tyr Val His Pro Ala  
 1 5  
  
 <210> 8  
 <211> 8  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 40  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 45 <223> Sarcosina  
  
 <220>  
 <223> Amidado en el extremo C  
  
 50 <400> 8  
 Xaa Arg Val Tyr Val His Pro Ala  
 1 5  
  
 <210> 9  
 <211> 8  
 55 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 60  
 <220>  
 <221> MOD\_RES



<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 <223> Amidado en el extremo C  
 10  
 <400> 13  
**Arg Val Tyr Ile His Pro**  
**1 5**  
  
 <210> 14  
 15 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 25 <223> Sarcosina  
  
 <400> 14  
**Xaa Arg Val Tyr Tyr His Pro Ile**  
**1 5**  
 30  
 <210> 15  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 40 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina  
  
 <220>  
 <223> Amidado en el extremo C  
 45  
 <400> 15  
**Xaa Arg Val Tyr Tyr His Pro Ile**  
**1 5**  
  
 <210> 16  
 50 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 55 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 60 <223> Sarcosina

<400> 16  
**Xaa Arg Val Tyr Glu His Pro Ile**  
**1 5**

5 <210> 17  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> L-tirosina, 3-hidroxi-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 2,6-difluoro-L-tirosina, 3-nitro-L-tirosina, 3,5-dinitro-L-tirosina o 3-cloro-L-tirosina

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> L-isoleucina, L-lisina o O-Metil-L-treonina

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina o L-alanina

35 <220>  
 <223> Véase la memoria presentada para una descripción detallada de las sustituciones y de las realizaciones preferidas

<400> 17  
**Xaa Arg Val Xaa Xaa His Pro Xaa**  
**1 5**

40 <210> 18  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> L-tirosina, 3-hidroxi-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina o 3-cloro-L-tirosina

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> O-Metil-L-treonina

<220>  
 <221> MOD\_RES



<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Sarcosina  
  
 <400> 22  
**Xaa Arg Val Tyr His His Pro Ala**  
 1 5  
  
 10 <210> 23  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 20 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina  
  
 <400> 23  
**Xaa Arg Val Tyr Lys His Pro Ala**  
 1 5  
 25  
 <210> 24  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 35 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina  
  
 <400> 24  
**Xaa Arg Val Tyr Arg His Pro Ala**  
 40 1 5  
  
 <210> 25  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <400> 25  
**Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 50 1 5  
  
 <210> 26  
 <211> 7  
 55 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 60  
 <220>  
 <221> MOD\_RES



<222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

<220>  
 5 <223> Amidado en el extremo C

<400> 26  
**Xaa Arg Val Tyr Tyr His Pro**  
 1 5

10 <210> 27  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 20 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 25 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina

<400> 27  
**Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 1 5

30 <210> 28  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 40 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 45 <222> (8)..(8)  
 <223> D-fenilalanina

<400> 28  
**Xaa Arg Val Tyr Tyr His Pro Phe**  
 50 1 5

<210> 29  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 60 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 5 <223> O-metil-tirosina

<400> 29  
**Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 1 5

10 <210> 30  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 20 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 25 <222> (5)..(5)  
 <223> O-metil-treonina

<400> 30  
**Xaa Arg Val Tyr Thr His Pro Ala**  
 1 5

30 <210> 31  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 40 <222> (1)..(1)  
 <223> N,N-dimetil-glicina

<400> 31  
**Gly Arg Val Tyr Val His Pro Ala**  
 45 1 5

<210> 32  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N,N-dimetil-glicina

60 <400> 32  
**Gly Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 1 5

<210> 33  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 10 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N-metil-L-alanina  
  
 <400> 33  
**Ala Arg Val Tyr Val His Pro Ala**  
 15 **1 5**  
  
 <210> 34  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 25 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N-metil-L-alanina  
  
 <400> 34  
**Ala Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 30 **1 5**  
  
 <210> 35  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 45 <223> Sarcosina  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 50 <223> Norvalina  
  
 <400> 35  
**Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Xaa**  
 1 5  
  
 <210> 36  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(18)  
 <223> cíclico  
 5  
 <400> 36  
 Arg Val Tyr Ile His Pro Arg Val Tyr Ile His Pro Arg Val Tyr Ile  
 1 5 10 15  
  
 His Pro  
  
 10 <210> 37  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 20 <222> (1)..(18)  
 <223> cíclico  
  
 <400> 37  
 Phe Val Tyr Ile His Pro Phe Val Tyr Ile His Pro Phe Val Tyr Ile  
 1 5 10 15  
  
 His Pro  
  
 25 <210> 38  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 35 <222> (1)..(6)  
 <223> cíclico  
  
 <400> 38  
 Val Tyr Ile His Pro Phe  
 40 1 5  
  
 <210> 39  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina  
  
 55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)

<223> L-tirosina, 3-hidroxi-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 2,6-difluoro-L-tirosina, 3-nitro-L-tirosina, 3,5-dinitro-L-tirosina o 3-cloro-L-tirosina

<220>

5 <223> Amidado en el extremo C

<400> 39

**Xaa Arg Val Xaa Tyr His Pro**  
**1 5**

10 <210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

20 <221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Sarcosina

<220>

25 <223> Amidado en el extremo C

<400> 40

**Xaa Arg Val Tyr Glu His Pro**  
**1 5**

30 <210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

40 <221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Sarcosina

<220>

45 <223> Amidado en el extremo C

<400> 41

**Xaa Arg Val Tyr Phe His Pro**  
**1 5**

50 <210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

60 <221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Sarcosina

<220>

<223> Amidado en el extremo C

<400> 42  
**Xaa Arg Val Tyr His His Pro**  
 1 5

5 <210> 43  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

20 <220>  
 <223> Amidado en el extremo C

20 <400> 43  
**Xaa Arg Val Tyr Lys His Pro**  
 1 5

25 <210> 44  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N-metil-L-alanina

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina

40 <400> 44  
**Ala Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 1 5

45 <210> 45  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

60 <220>  
 <223> Amidado en el extremo C

60 <400> 45  
**Xaa Arg Val Tyr Arg His Pro**  
 1 5

<210> 46  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 10 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N-metil-L-alanina  
  
 <220>  
 15 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina  
  
 <400> 46  
**Ala Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 20    1                    5  
  
 <210> 47  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 30 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N-metil-D-alanina  
  
 <400> 47  
**Ala Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 35    1                    5  
  
 <210> 48  
 <211> 8  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 45  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina  
 50  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina  
 55  
 <400> 48  
**Xaa Arg Val Phe Ile His Pro Ala**  
    1                    5  
  
 <210> 49  
 60 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina

<400> 49  
**Xaa Lys Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 15 1 5

<210> 50  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina

35 <400> 50  
**Xaa Arg Val Tyr Ile Lys Pro Ala**  
 1 5

<210> 51  
 <211> 7  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 <223> D-prolina

55 <220>  
 <223> Amidado en el extremo C

<400> 51  
**Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro**  
 60 1 5

<210> 52  
 <211> 7



<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 10 <223> Sarcosina  
  
 <400> 52  
**Xaa Arg Val Tyr Tyr His Pro**  
**1 5**  
  
 15 <210> 53  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 25 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 30 <222> (5)..(5)  
 <223> D-alanina  
  
 <220>  
 <223> Amidado en el extremo C  
 35  
 <400> 53  
**Xaa Arg Val Tyr Ala His Pro**  
**1 5**  
  
 40 <210> 54  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 50 <223> Sarcosina  
  
 <400> 54  
**Xaa Arg Val Tyr Val His Pro**  
**1 5**  
  
 55 <210> 55  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 60 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina  
 5  
 <220>  
 <223> Amidado en el extremo C  
 <400> 55  
**Xaa Arg Val Tyr Val His**  
 10     1                     5  
 <210> 56  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 20 <400> 56  
**Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Gly**  
       1                     5  
 25 <210> 57  
       <211> 7  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
       <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
       <220>  
       <223> Amidado en el extremo C  
 35 <400> 57  
**Asp Arg Val Tyr Tyr His Pro**  
       1                     5  
 40 <210> 58  
       <211> 7  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
       <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
       <220>  
       <221> MOD\_RES  
       <222> (1)..(1)  
 50 <223> ácido D-aspártico  
       <220>  
       <223> Amidado en el extremo C  
 55 <400> 58  
**Asp Arg Val Tyr Tyr His Pro**  
       1                     5  
       <210> 59  
       <211> 7  
 60 <212> PRT  
       <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

5 <220>  
 <223> Amidado en el extremo C

<400> 59  
**Glu Arg Val Tyr Tyr His Pro**  
 1 5

10 <210> 60  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 20 <222> (1)..(1)  
 <223> ácido D-glutámico

<220>  
 <223> Amidado en el extremo C

25 <400> 60  
**Glu Arg Val Tyr Tyr His Pro**  
 1 5

30 <210> 61  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 40 <223> N-metil-ácido L-aspartico

<220>  
 <223> Amidado en el extremo C

45 <400> 61  
**Asp Arg Val Tyr Tyr His Pro**  
 1 5

<210> 62  
 <211> 7  
 50 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N-metil-ácido L-glutámico

60 <220>  
 <223> Amidado en el extremo C

<400> 62  
**Glu Arg Val Tyr Tyr His Pro**  
 1 5

5 <210> 63  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>  
 <223> Amidado en el extremo C

15 <400> 63  
**Asp Arg Val Tyr Phe His Pro**  
 1 5

20 <210> 64  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>  
 <223> Amidado en el extremo C

30 <400> 64  
**Glu Arg Val Tyr Phe His Pro**  
 1 5

35 <210> 65  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N-metil-ácido L-aspártico

45 <220>  
 <223> Amidado en el extremo C

50 <400> 65  
**Asp Arg Val Tyr Phe His Pro**  
 1 5

55 <210> 66  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N-metil-ácido L-glutámico

<220>  
 <223> Amidado en el extremo C

5 <400> 66  
**Glu Arg Val Tyr Phe His Pro**  
 1 5

<210> 67  
 <211> 8  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 3-Hidroxi-L-tirosina

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina

30 <400> 67  
**Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 1 5

35 <210> 68  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 2,6-Dimetil-L-tirosina

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina

<400> 68  
**Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 1 5

60 <210> 69  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 3-Fluoro-L-tirosina

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina

20 <400> 69  
**Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
**1 5**

<210> 70  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 4-fluorofenil-L-alanina

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina

45 <400> 70  
**Xaa Arg Val Ala Ile His Pro Ala**  
**1 5**

<210> 71  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)

60 <223> Sarcosina

<220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (4)..(4)  
 <223> 2,6-Difluoro-L-tirosina

<220>  
 5 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina

<400> 71  
**Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 10 1 5

<210> 72  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 3-Nitro-L-tirosina

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina

35 <400> 72  
**Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 1 5

<210> 73  
 <211> 8  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 3,5-Dinitro-L-tirosina

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina

60 <400> 73  
**Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 1 5

<210> 74  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 10 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina  
 <220>  
 15 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 3,5-Dibromo-L-tirosina  
 <220>  
 20 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina  
 <400> 74  
**Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 25 **1 5**  
 <210> 75  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina  
 40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 3-Cloro-L-tirosina  
 45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina  
 50 <400> 75  
**Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
**1 5**  
 <210> 76  
 <211> 8  
 55 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina



<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 5 <223> O-alil-L-tirosina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 10 <223> D-alanina

<400> 76  
**Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
**1 5**

15 <210> 77  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 25 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 30 <222> (4)..(4)  
 <223> 3-Hidroxi-L-tirosina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 35 <222> (5)..(5)  
 <223> O-metil-treonina

<400> 77  
**Xaa Arg Val Tyr Thr His Pro Ala**  
**1 5**

40 <210> 78  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 50 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 55 <222> (4)..(4)  
 <223> 3-fluoro-L-tirosina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 60 <222> (5)..(5)  
 <223> O-metil-treonina

<400> 78  
**Xaa Arg Val Tyr Thr His Pro Ala**  
**1 5**

5 <210> 79  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 3-cloro-L-tirosina

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> O-metil-treonina

<400> 79  
**Xaa Arg Val Tyr Thr His Pro Ala**  
**1 5**

30 <210> 80  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Ácido pirrolid-1-il acético

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina

<400> 80  
**Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
**1 5**

50 <210> 81  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Ácido morfolin-4-il acético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina  
 5  
 <400> 81  
**Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 1 5  
 <210> 82  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N-metil-D-alanina  
 20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina  
 25  
 <400> 82  
**Ala Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
 1 5  
 30  
 <210> 83  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina  
 40  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Norvalina  
 45  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina  
 50  
 <400> 83  
**Xaa Arg Val Tyr Xaa His Pro Ala**  
 1 5  
 55  
 <210> 84  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina  
 5

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> O-metil-treonina  
 10

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina  
 15

<400> 84  
**Xaa Arg Val Tyr Thr His Pro Ala**  
**1                                    5**

<210> 85  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 20

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 25

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina  
 30

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 3,5-diiodo-L-tirosina  
 35

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina  
 40

<400> 85  
**Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ala**  
**1                                    5**

<210> 86  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 45

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 50

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N-metil-L-alanina  
 55

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> L-tirosina, 3-hidroxil-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 2,6-difluoro-L-tirosina, 3-nitro-L-tirosina, 3,5-dinitro-L-tirosina  
 o 3-cloro-L-tirosina  
 60

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> L-isoleucina, L-lisina o O-metil-L-treonina  
 5

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina o L-alanina  
 10

<400> 86  
**Ala Arg Val Xaa Xaa His Pro Xaa**  
**1 5**

<210> 87  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 15

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 20

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina  
 25

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> L-isoleucina, glicina, L-tirosina  
 30

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> L-valina, L-isoleucina, ácido L-glutámico  
 35

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> L-isoleucina, L-glicina, o L-alanina  
 40

<400> 87  
**Xaa Arg Val Xaa Xaa His Pro Xaa**  
**1 5**

<210> 88  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 45

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 50

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina  
 55

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> L-tirosina, 3-hidroxi-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 2,6-difluoro-L-tirosina, 3-nitro-L-tirosina, 3,5-dinitro-L-tirosina  
 o 3-cloro-L-tirosina  
 60

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> L-valina o L-isoleucina  
 5

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina  
 10

<400> 88  
**Xaa Arg Val Xaa Xaa His Pro Xaa**  
 1                      5

<210> 89  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 15

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 20

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Sarcosina  
 25

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina o 3-cloro-L-tirosina  
 30

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> O-metil-treonina  
 35

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-alanina  
 40

<400> 89  
**Xaa Arg Val Xaa Thr His Pro Xaa**  
 1                      5

45

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende la secuencia de Sar-Arg-Val-Ww-Zz-His-Pro-Cc, en la que Ww es L-tirosina, 3-hidroxi-L-tirosina, 3-fluoro-L-tirosina, 2,6-difluoro-L-tirosina, 3-nitro-L-tirosina, 3,5-dinitro-L-tirosina, o 3-cloro-L-tirosina,  
5 Zz es L-valina o L-isoleucina,  
y Cc es D-alanina.
2. El péptido de la reivindicación 1, en el que Ww es L-tirosina.
3. El péptido de las reivindicaciones 1 o 2, en el que Zz es L-isoleucina.
4. El péptido de las reivindicaciones 1 o 2, en el que Zz es L-valina.
- 10 5. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido comprende la secuencia de SEC ID N°. 27.
6. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el péptido es cíclico, dimerizado o trimerizado.
7. Una composición que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. La composición de la reivindicación 7, en la que el péptido consiste en la secuencia de SEC ID N°. 27.
9. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un  
15 vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que el péptido comprende SEC ID N°. 27.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que el péptido consiste en SEC ID N°. 27.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable es agua  
estéril, solución salina tamponada con fosfato o una disolución acuosa de glucosa.
- 20 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable es agua  
estéril.
14. Uso de un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o el uso de una composición farmacéutica de  
una cualquiera de las reivindicaciones 9-13 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno  
cardiovascular.
- 25 15. Un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una composición farmacéutica de una cualquiera de  
las reivindicaciones 9-13 para su uso en el tratamiento de un trastorno cardiovascular.
16. El uso de la reivindicación 14, o el péptido o composición para su uso según la reivindicación 15, en el que el  
trastorno cardiovascular está seleccionado del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca aguda descompensada,  
hipertensión crónica, crisis hipertensiva, insuficiencia cardíaca aguda congestiva, angina, infarto agudo de miocardio,  
30 insuficiencia ventricular izquierda, insuficiencia cerebrovascular, hemorragia intracraneal, hipertensión esencial,  
hipertensión posoperatoria, enfermedad cardíaca hipertensiva, enfermedad renal hipertensiva, hipertensión  
renovascular, hipertensión maligna, estabilización del paciente tras trasplante renal, cardiomiopatía dilatada,  
miocarditis, estabilización del paciente tras trasplante cardíaco, trastornos asociados a tratamiento posterior a  
prótesis endovascular, hipertensión neurogénica, preeclampsia y aneurisma de la aorta abdominal.
- 35 17. El uso de la reivindicación 14, o el péptido o composición para su uso según la reivindicación 15, en el que el  
trastorno cardiovascular es insuficiencia cardíaca.
18. El uso de la reivindicación 17, o el péptido o composición para su uso según la reivindicación 17, en el que la  
insuficiencia cardíaca es insuficiencia cardíaca aguda.
- 40 19. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 14, o 16-18, o el péptido o composición para su uso según una  
cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en el que el tratamiento produce una disminución en la resistencia vascular  
renal, en el que el péptido es un péptido de las reivindicaciones 5 u 8, o la composición farmacéutica es una  
composición farmacéutica de las reivindicaciones 10 u 11.
- 45 20. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 14, o 16-18, o el péptido o composición para su uso según una  
cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en el que el tratamiento produce el mantenimiento de la tasa de filtración  
glomerular, en el que el péptido es un péptido de las reivindicaciones 5 u 8, o la composición farmacéutica es una  
composición farmacéutica de las reivindicaciones 10 u 11.
21. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 14, o 16-18, o el péptido o composición para su uso según una  
cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en el que el medicamento o péptido o composición va a administrarse  
mediante inyección intravenosa.